

**Die Determination der Founder- und fusionskompetenten Zellen
des viszeralen Mesoderms von *Drosophila melanogaster* ist
abhängig von Notch
sowie Jeb/Alk vermitteltem RTK-Signalweg**

Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem
Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Christiana Stute
aus Büren

Marburg/Lahn 2004

Vom Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg als Dissertation am

angenommen

Erstgutachter: Prof. Dr. Renate Renkawitz-Pohl

Zweitgutachter: Prof. Dr. Monika Hassel

Tag der mündlichen Prüfung am:

Inhaltsverzeichnis:

1. Zusammenfassung	1
2. Einleitung	2
2.1 Die embryonale Entwicklung des Mesoderms bei <i>Drosophila melanogaster</i>	3
2.2 Die Differenzierung der viszeralen Mitteldarmmuskulatur	5
2.3 Die Fusion der somatischen Myoblasten	6
2.4 Die Rolle des Notch-Signalweges während der Embryonalentwicklung von <i>Drosophila</i>	9
2.5 Die Funktion von Rezeptor-Tyrosin-Kinasen während der Entwicklung von <i>Drosophila</i>	11
2.6 Problemstellung	14
3. Material	16
3.1 Geräte	16
3.2 Chemikalien	17
3.3 Enzyme	17
3.4 Molekularbiologische Reagenzien und Reagenziensätze	18
3.5 Antikörper und Seren	19
3.6 Fliegenstämme (<i>Drosophila melanogaster</i>)	21
3.6.1 Balancerstämme	21
3.6.2 Defizienzen	21
3.6.3 P-Element-Insertionen	22
3.6.4 Mutanten	22
3.6.5 UAS- und GAL4-Stämme	23
3.6.6 Sonstige	24
3.7 Bakterienstämme (<i>Escherichia coli</i>)	24
3.8 Plasmide	24
3.9 Synthetische Oligonukleotide	26
3.10 Zell-Linien	26
3.11 Auftragsarbeiten	26
4. Methoden	27
I. Präparation und Analyse von DNA	27
4.1 Herstellung chemisch kompetenter Zellen	27
4.2 Stammhaltung und Kultivierung von Bakterienstämmen	28
4.3 Transformation chemisch kompetenter Bakterien	28
4.4 Präparation von DNA	28
4.4.1 Mini-Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> (alkalische Lyse)	28
4.4.2 Midi-Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	29
4.4.3 Präparation genomischer DNA aus <i>Drosophila</i>	30
4.4.4 DNA-Präparation aus BAC-Klonen	30
4.5 Gelelektrophorese von DNA in Agarosegelen	30
4.6 Aufreinigung von DNA-Fragmenten	31
4.6.1 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	31
4.6.2 DNA-Isolierung aus Lösungen	32

4.6.3	Aufreinigen von DNA für die Injektion in Fliegen	32
4.7	Photometrische Konzentrationsbestimmung	33
4.8	Klonierungstechniken	33
4.8.1	Enzymatische Spaltung von DNA mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen	33
4.8.2	Dephosphorylierung von freien 5'-Enden	34
4.8.3	Ligation	34
4.8.4	Polymerase-Ketten-Reaktion	34
4.9	Markierung von RNA- und DNA-Sonden	35
4.9.1	Markierung von RNA-Sonden mittels <i>in vitro</i> Transkription	35
4.9.2	Markierung von DNA-Sonden mittels PCR	36
4.9.3	Markierung von DNA-Sonden mit Hilfe von Zufallsprimern	36
4.9.4	Spot-Test DIG-markierter DNA-Sonden	37

II. Arbeiten mit *Drosophila melanogaster* 38

4.10	Stammhaltung und Zucht von <i>Drosophila melanogaster</i>	38
4.11	<i>Drosophila</i> -Kreuzungen	38
4.12	<i>Drosophila</i> -Embryonen Ablagen	39
4.13	Fixierung von Fliegenembryonen	39
4.14	P-Element Keimbahntransformationen von <i>Drosophila</i>	40
4.14.1	Vorbereitung der Embryonen	40
4.14.2	Mikroinjektion	41
4.14.3	Selektion transformierter Fliegen	41
4.15	Das <i>UAS-GAL4</i> -System	42
4.16	Letalitätstest	43

III. Histologische Methoden 44

4.17	Antikörperfärbung nach der „Avidin-Biotinylated Enzyme Complex“-Methode (ABC-Methode)	44
4.17.1	Fluoreszenz-Antikörperfärbung und Verstärkung mit dem TSA-Kit	45
4.18	<i>in situ</i> -Hybridisierungen an fixierten <i>Drosophila</i> -Embryonen	46
4.18.1	Fluoreszenz <i>in situ</i> -Hybridisierung	47
4.19	Kutikula-Präparate	48

IV Methoden der Zellkultur 49

4.20	Kultivierung von Säugetierzellen	49
4.21	Transfektion der Säugetierzellen	50
4.21.1	Transfektion mit $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	50
4.21.2	Transfektion mit FuGENE6	50
4.22	RIPA-Lyse von Säugetierzellen	51
4.23	Antigennachweis durch Immunhistologie an Säugetierzellen	52
4.23.1	Herstellung des PVA-DABCO Einbettungsmediums	52

V Präparation und Analyse von Proteinen 53

4.24	Proteinbestimmung	53
4.25	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proteinen (SDS-PAGE)	53
4.26	Western Blot Analyse	54

5. Ergebnisse	56
I. Etablierung einer <i>GAL4</i>-Treiberlinie zur spezifischen Expression in den fusionskompetenten Myoblasten	56
5.1 Generierung eines <i>GAL4</i> -Vektors	57
5.2 Ein 2,5 kb <i>sns</i> Promotorkonstrukt aktiviert die <i>lacZ</i> -Expression in den fusionskompetenten Myoblasten des somatischen und viszerale Mesoderms	58
5.3 Die durch das <i>psns4,5-GAL4</i> -Konstrukt bewirkte β -Galaktosidase Expression ist translational reprimiert	62
II. Vergleich der Determination der Founderzellen und fusionskompetenten Myoblasten in der somatischen und viszerale Muskulatur	64
5.4 <i>lethal of scute</i> ist nicht essentiell für die Ausbildung des viszerale Mesoderms	64
5.4.1 Generierung eines RNAi-Konstrukts zur posttranskriptionellen Genunterdrückung von <i>lethal of scute</i>	65
5.4.2 Ektopische Expression von <i>UAS-lethal of scute</i> im viszerale Mesoderm von <i>Drosophila</i> führt zur Erhöhung der Zahl der Founderzellen und einem Verlust von fusionskompetenten Myoblasten	69
5.4.3 Eine Expression von Lethal of scute im viszerale Mesoderm konnte nicht nachgewiesen werden	69
5.5 Notch beeinflusst die Founderzell-Determination im viszerale Mesoderm	70
5.5.1 Notch ist im viszerale Mesoderm und Delta in den benachbarten Geweben exprimiert	71
5.5.2 Embryonen in denen N^{intra} im viszerale Mesoderm exprimiert wurde sterben als 1. Larve	73
5.6 Kuzbanian hat keinen Einfluß auf die Determination der Founderzellen im viszerale Mesoderm	74
5.7 Suppressor of Hairless ist nicht essentiell für die Vermittlung des Notch-Signalweges in der viszerale Muskulatur	76
III. Screen zur Identifizierung neuer an der Ausbildung des viszerale Mesoderms beteiligter Faktoren	79
5.8 Durch den Screen einer Kollektion EMS-mutagenisierter Fliegen werden acht Fliegenlinien erhalten	79
III.a Analyse der Mutanten der 1. Gruppe	80
5.9 <i>wellville</i> (<i>weli</i>) und <i>milliways</i> (<i>mili</i>) sind durch den spezifischen Verlust der Founderzellen in der viszerale Muskulatur charakterisiert	80
5.10 Identifizierung von <i>jelly belly</i> (<i>jeb^{weli}</i>) und seinem Rezeptor <i>milliways</i> (<i>milt^{Alk}</i>)	82
5.10.1 Der Phänotyp von <i>jeb^{weli}</i> und <i>milt^{Alk}</i> kann durch Expression der <i>jeb</i> bzw. <i>Alk</i> cDNA sowie einer aktivierten Form von <i>Alk</i> gerettet werden	83
5.11 <i>Alk</i> ist in <i>mili^{Alk}</i> Mutanten fehllokalisiert	85

5.12	Jeb ist im viszeralen Mesoderm der Ligand für die Rezeptor Tyrosin Kinase <i>Mil^{Alk}</i>	86
5.12.1	Alk und Jeb ko-lokalisieren an der Membran der viszeralen Founderzellen	86
5.12.2	Durch eine erhöhte Menge an Jeb-Ligand werden alle Zellen des viszeralen Mesoderms zu Founderzellen	88
5.13	Die Zellen des viszeralen Mesoderms in <i>jeb^{weli}</i> und <i>mili^{Alk}</i> Mutanten differenzieren ausschließlich zu fusionskompetenten Myoblasten	89
5.14	Jeb und Alk sind für die Differenzierung der fusionskompetenten Myoblasten in der somatischen Muskulatur verantwortlich	90
5.15	Die fusionskompetenten Myoblasten des viszeralen Mesoderms können an der Ausbildung des somatischen Mesoderm teilnehmen	91
5.16	Die ektopische Expression von <i>UAS-Alk</i> im gesamten Mesoderm bewirkt den gleichen Phänotyp wie in <i>jeb^{weli}</i> und <i>mili^{Alk}</i> Mutanten	93
5.17	Analyse der Funktion von Alk in Wirbeltierzellen	96
5.17.1	Bestimmung der Abhängigkeit der Myoblastendifferenzierung von der Serumkonzentration	97
5.17.2	Transfektion der Zell-Linien mit Alk	98
	III.b Analyse der Mutanten auf der 2. und 3. Gruppe	103
5.18	Das viszerale Mesoderm der Mutanten V3, V6 und V8 umschließt nicht den Mitteldarm	103
5.19	Den Mutanten V4, V5 und V7 fehlt das viszerale Mesoderm	105
5.19.1	V5 zeigt neben dem viszeralen Phänotyp schwache Defekte im somatischen Mesoderm	107
5.20	Genetische Analyse der Mutanten	109
	6. Diskussion	112
6.1	Analyse der <i>sns</i> -Promoterregion	112
6.1.1	<i>sns4,5-GAL4</i> kann als <i>GAL4</i> -Treiberlinie für die zeit- und gewebespezifische Expression in den FCM's eingesetzt werden	115
6.2	<i>lethal of scute</i> scheint für die Determination eines Teils der Founderzellen im viszeralen Mesoderm essentiell zu sein	116
6.2.1	Das RNAi- <i>l'sc</i> Konstrukt bewirkt einen partiellen Verlust der Founderzellen im viszeralen Mesoderm	117
6.3	Die Funktion des Notch-Signalweges bei der Determination der Founderzellen des viszeralen Mesoderms	120
6.3.1	Notch wirkt im viszeralen Mesoderm nicht über den kanonischen Signalweg	120
6.3.2	Delta könnte der Notch Ligand im viszeralen Mesoderm sein	123
6.3.3	Kuzbanian ist nicht an der Notch-Prozessierung im viszeralen Mesoderm beteiligt	124
6.4	Effektivität des Screens der Kollektion der EMS-mutagenisierten Fliegen	125
6.5	<i>milliways^{Alk}</i> und <i>jelly belly^{weli}</i> sind essentiell für die Ausbildung des viszeralen Mesoderms	126
6.5.1	Eine aktivierte Form von Alk konvertiert nicht alle Zellen des viszeralen Mesoderms zu Founderzellen	129
6.5.2	Die Überexpression von <i>UAS-Alk</i> phänotypisiert den Verlust des Liganden Jelly belly	130
6.6	Alk scheint kein Aktivator der myogenen Differenzierung in Säugerzellen zu sein	131
6.7	Ausblick	133

7. Literatur	136
8. Abkürzungen	148
9. Anhang	152
9.1 Transkriptionsfaktor-Bindestellen	152
9.2 Komplementationstest der Mutanten V3, V5, V6 und V7	152

1. Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung von Faktoren, die zur Determination der Founder- und fusionskompetenten Zellen (FCM's) in der viszeralen Muskulatur von *Drosophila melanogaster* führen, sowie die Etablierung einer *GAL4*-Treiberlinie für die Expression in den FCM's. Als Voraussetzung für die Generierung der FCM spezifischen *GAL4*-Treiberlinie wurde die Genkontrollregion von *sticks and stones* bestimmt. Um das volle Expressionsmuster zu bewirken sind 4,5 kb stromaufwärts des Transkriptionsstartes ausreichend, welche in einen neu generierten *GAL4*-Vektor ligiert wurden.

Für die Untersuchung der Mechanismen, die an der Zell-Determination im viszeralen Mesoderm beteiligt sind, wurden zwei unterschiedlichen Ansätze gewählt. Zunächst sollten Analogien zum Determinationsprozeß in der somatischen Muskulatur analysiert werden. Hier ist vor allem Notch, mit dem Prozeß der lateralen Inhibition, wichtig für die Selektion der Vorläuferzellen, aus einer Gruppe von Lethal of scute exprimierenden Zellen. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Analysen zeigen, daß Notch auch im viszeralen Mesoderm in der Determination der Founderzellen involviert ist. Ebenso scheint Lethal of scute für diesen Prozeß wichtig zu sein, wie durch RNAi-Experimente und Mutanten Analyse gezeigt werden konnte. Andere Komponenten, die am Prozeß der lateralen Inhibition beteiligt sind, haben keinen Einfluß auf den Determinationsprozeß in der viszeralen Muskulatur. Notch scheint daher im viszeralen Mesoderm über einen alternativen Signalweg zu wirken.

Des weiteren wurde eine Kollektion EMS-mutagenisierter Fliegen durchgemustert, um Faktoren zu identifizieren, die einen Defekt in der viszeralen Muskulatur aufweisen. Hierdurch wurden acht Mutanten identifiziert, die sich in drei Gruppen einteilen lassen. Bei der ersten Gruppe besteht das viszerale Mesoderm nur aus FCM's und ist nach dem Stadium 11 nicht mehr zu detektieren. Bei der zweiten Gruppe wird das viszerale Mesoderm zunächst normal ausgebildet, es umschließt dann aber nicht den Mitteldarm. Die dritte Gruppe bildet kein viszerales Mesoderm aus. Genetische Analysen der zwei Mutanten der ersten Gruppe zeigten, daß sie neue Allele des vom somatischen Mesoderm sekretierten Faktors Jelly belly und der im viszeralen Mesoderm exprimierten Rezeptor Tyrosin Kinase Alk sind, deren Zusammenwirken im gleichen Signalweg gezeigt werden konnte. Die beiden Mutanten weisen, neben den fehlenden Founderzellen in der viszeralen Muskulatur, einen spezifischen Verlust der FCM's in der somatischen Muskulatur auf. Dieser Verlust wird allerdings durch die normal differenzierten FCM's des viszeralen Mesoderms wieder ausgeglichen. Der neu identifizierte Alk vermittelte Jeb-Signalweg ist also für die Determination der Founderzellen in der viszeralen, sowie der FCM's in der somatischen Muskulatur essentiell.

2. Einleitung

Der Fokus der modernen Entwicklungsbiologie liegt auf der Untersuchung der Mechanismen, welche die Entwicklung multizellulärer Organismen steuern. Die in unterschiedlichen Modellorganismen, wie z. B. *Arabidopsis thaliana*, *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster* oder der Maus gewonnenen Erkenntnisse führen, neben Einblicken in die Vielseitigkeit der Vorgänge, zum besseren Verständnis allgemeingültiger Entwicklungsprozesse.

Die Muskulatur so unterschiedlicher Organismen wie z.B. der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* oder des Menschen ist aus synzytialen Muskelfasern aufgebaut. Daher werden die Fusionsprozesse, die zur Bildung der somatischen Muskulatur in *Drosophila* führen, schon seit längerem untersucht. Hierdurch können Hinweise auf die Mechanismen erhalten werden, die für die Ausbildung der Muskulatur der Wirbeltiere wichtig sind. Kürzlich wurde beobachtet, daß auch die viszerale Muskulatur des Mitteldarms von *Drosophila* aus Synzytien besteht. Da diese aus nur zwei miteinander fusionierten Zellen gebildet werden, stellen sie das denkbar einfachste System dar, um grundlegende Mechanismen des Fusionsprozesses zu analysieren.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit den Mechanismen, die zur Determination unterschiedlicher, für die Fusionen relevanter Zelltypen im viszeralen Mesoderm des Mitteldarms von *Drosophila* führen. In den folgenden einleitenden Kapiteln wird ein Einblick in die Entwicklung der mesodermalen Gewebe in *Drosophila*, sowie eine Zusammenfassung der bekannten, zur Determination beitragenden Mechanismen gegeben.

2.1 Die embryonale Entwicklung des Mesoderms bei *Drosophila melanogaster*

Die Gastrulation stellt den zentralen Mechanismus dar, der in höheren Organismen zur Bildung der drei Keimblätter führt. Bei *Drosophila melanogaster* invaginieren im Stadium 6 die Zellen des Endoderms und Mesoderms, die sich am ventralen Pol des Embryos befinden. Die mesodermalen Zellen zeichnen sich durch eine hohe Konzentration des maternalen, Achsen determinierenden Proteins Dorsal im Zellkern aus. Hier schaltet es die Expression der Gene *twist* (*twi*) und *snail* an. Der Einfluß dieser Faktoren bewirkt die Invagination dieser Zellen. Sie verlieren ihren epithelial Charakter, wandern unter dem Einfluß des FGF-Rezeptors *heartless* (*htl*) (Baylies et al., 1998) nach dorsal und bilden so das mesodermale Keimblatt. Aus dem Mesoderm entstehen später unterschiedliche Gewebe, wie die viszerale und somatische Muskulatur, das Herz und der Fettkörper (Übersichtsartikel: Bate, 1993).

Direkt nach der Invagination sind die mesodermalen Zellen noch gleichartig. Sie exprimieren alle den Transkriptionsfaktor *twi* und seine direkten Zielgene *tinman* (*tin*) und *mef2* (*myocyte-specific enhancing factor 2*) (Bodmer et al., 1993; Lilly et al., 1994; Bour et al., 1995; Lilly et al., 1995; Taylor et al., 1995). Im Laufe der Entwicklung wird die Uniformität der Zellen durch Einflüsse aus dem Ektoderm aufgehoben (siehe auch Abb. 2.1). Dazu werden die Zellen sowohl in der dorsal-ventralen als auch in der anterior-posterioren Achse unterteilt. Die dorsalen Zellen des Mesoderms, die zur Anlage des Herzens (rot in Abb. 2.1) und des viszeralen Mesoderms (blau in Abb. 2.1) werden, gelangen unter den Einfluß des zur TGF- β -Familie gehörenden Decapentaplegic (Dpp) aus dem Ektoderm. Dpp bewirkt die Fortsetzung der Twist-abhängigen Expression von *tin* in diesen Zellen (Frasch, 1995; Maggert et al., 1995). Die ventralen Zellen, welche in Kontakt mit dem darüber liegenden Neuroektoderm kommen, bilden das somatische Mesoderm (gelb in Abb. 2.1) (Dohrmann, 1990; Leptin et al., 1992; Azpiazu und Frasch, 1993; Bate und Rushton, 1993). Zur gleichen Zeit wird das Mesoderm auch in der antero-posterioren Richtung unterteilt. Hier wirken die Segmentpolaritätsgene *even skipped* (*eve*) (Azpiazu et al., 1996) und *sloppy paired* (*slp*) (Riechmann et al., 1997) sowohl direkt, indem sie die Expression von *bagpipe* (*bap*) und *tin* regulieren, als auch indirekt durch ihre Expression im Ektoderm. Daraus resultiert die Aktivierung der Effektorgene *engrailed* (*en*), *hedgehog* (*hh*) und *wingless* (*wg*) (Riechmann et al., 1997). Im anterioren Teil eines Parasegments (PS), in dem *eve* exprimiert ist, werden die Anlagen des viszeralen Mesoderms und des Fettkörpers (violett in Abb. 2.1) gebildet. Die Wirkung von Eve wird durch die Aktivität von Hh unterstützt, welches die normale

Aktivierung von *bap* und *serpent* (*srp*) reguliert. In der posterioren Domäne, welche durch die *slp* Expression charakterisiert ist, werden die Anlagen des Herzens und der somatischen Muskulatur gebildet. Hier reprimiert *wg* die Expression von *bap* und *srp* und hält die Expression von *twi* aufrecht (Baylies et al., 1998).

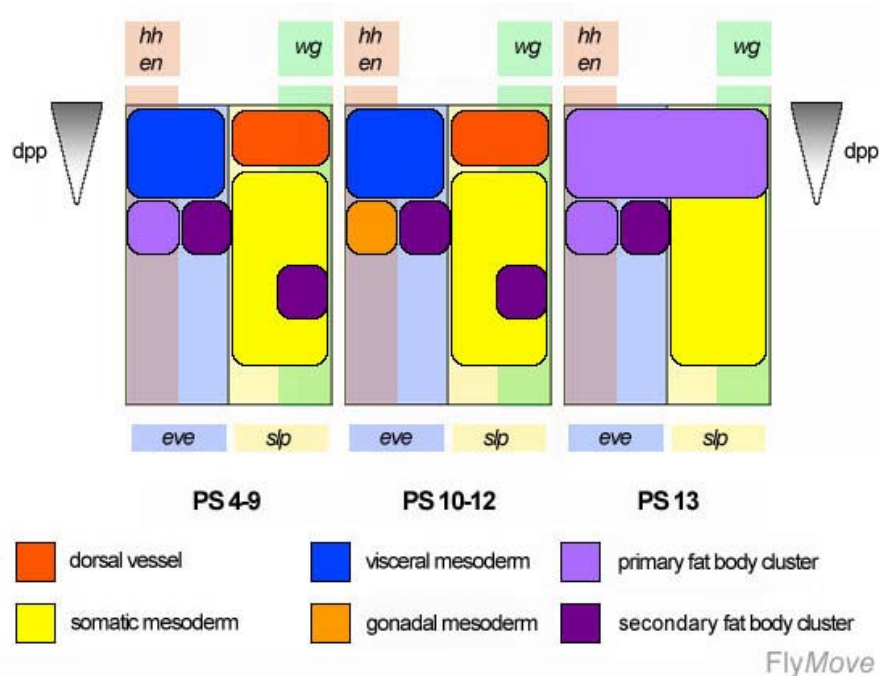


Abb. 2.1: Die Differenzierung des Mesoderms in unterschiedliche Anlagen. Die Zellen des mesodermalen Keimblattes werden durch die Aktivität von verschiedenen Genen, welche intrinsisch wirkende Transkriptionsfaktoren (Eve/Slp) oder extrinsisch wirkende Signalmoleküle (Wg/Hh/Dpp) kodieren, in unterschiedliche Domänen unterteilt, die sich später zum Herz, dem somatischen, visceralen und gonaden Mesoderm, sowie dem Fettkörper ausdifferenzieren. (Abb. aus: <http://www.flymove.de>; nach Riechmann et al., 1997).

Im Stadium 10 beginnen sich die Zellen des Mesoderms räumlich zu trennen. Das Somatopleura, aus welchem sich später die somatische Muskulatur entwickelt, wandert nach außen, die Zellen verlieren ihren epithelialen Charakter und differenzieren sich zu zwei Typen von Myoblasten. Diese zwei Zellgruppen fusionieren miteinander und bilden eine spezifische Anordnung von Myotuben (siehe auch Abschnitt 2.3). Aus der inneren Schicht des Mesoderms geht das Splanchnopleura hervor. Hieraus entwickelt sich später die viszerale Muskulatur. Das Herz entsteht aus den dorsal liegenden Zellen des Somatopleuras.

2.2 Die Differenzierung der viszeralen Mitteldarmmuskulatur

Die viszerale Muskulatur des Mitteldarms von *Drosophila melanogaster* besteht aus zwei übereinander liegenden Schichten unterschiedlichen Ursprungs (Campos-Ortega und Hartenstein, 1997). Die innere, zirkuläre viszerale Muskulatur entstammt dem Rumpfmesoderm, wo sie zunächst im Stadium 10 in elf Zellgruppen an jeder Seite des Embryos erkennbar ist, die sich später zu zwei durchgängigen Bändern vereinigen. Die Vorläufer der äußeren Schicht, der sogenannten longitudinalen viszeralen Muskulatur, entstammen dem posterioren Pol des Embryos. Nachdem die Vorläufer der longitudinalen viszeralen Muskulatur sich in zwei Gruppen zu beiden Seiten des Keimstreifs aufgetrennt haben, wandern sie entlang des sich bildenden Bandes der zirkulären Muskulatur nach anterior. Wenn die longitudinalen Muskeln den anterioren Bereich des Mitteldarms erreicht haben beginnen sie, zusammen mit den zirkulären Muskeln, sich gleichmäßig über den Mitteldarm zu verteilen. Sie bilden eine regelmäßige Schicht aus 16-20 in antero-posteriorer Richtung ausgestreckten Muskelfasern. Diese erstrecken sich vom Proventrikulus bis zur Ansatzstelle der Malpighischen Gefäße (Georgias et al., 1997; Kusch und Reuter, 1999).

Für die Bildung der aus dem Splanchnopleura entstehenden zirkulären viszeralen Muskulatur sind die beiden Homeoboxgene *tinman* (*tin*) und *bagpipe* (*bap*) entscheidend (Bodmer, 1993; Azpiazu und Frasch, 1993). *Tin* ist für die Bildung aller dorsalen mesodermalen Gewebe essentiell und aktiviert die Expression von *bap*, welches für die Determination der viszeralen Mesodermanlage benötigt wird. *bap* wird in den elf Zellgruppen im Rumpfmesoderm exprimiert, die später die zirkuläre Muskulatur um den Mitteldarm bilden. Die Expression von *Bap* und *Tin* im viszeralen Mesoderm ist nur vorübergehend und lediglich verantwortlich für die Determination der Anlagen, nicht aber für deren Ausdifferenzierung. Hierfür wird der Forkhead Faktor *binou* (*bin*) benötigt, dessen Expression von *Bap* aktiviert wird. Die Anlage der longitudinalen viszeralen Muskulatur hingegen ist durch die Expression der Gene *brachyenteron* und *bHLH54F* gekennzeichnet und ist unabhängig von den durch *Bap* und *Bin* regulierten Genkaskaden (Georgias et al., 1997; Kusch und Reuter, 1999).

Im Zuge der Ausdifferenzierung des viszeralen Mesoderms werden einige Gene in der gesamten Darmmuskulatur exprimiert. *Bap* und *Bin* aktivieren die Expression charakteristischer Gene im viszeralen Mesoderm, wie z.B. *vimar* (Lo und Frasch, 1998) oder β 3-*tubulin* (Zaffran und Frasch, 2002). Die Expression von β 3-*tubulin* im viszeralen Mesoderm ist zudem abhängig von *Tinman* und *Ubx* (Kremser et al., 1999). *fasciclin III*

(*fasIII*) ist ab dem Stadium 10 ebenfalls im gesamten viszerale Mesoderm zu finden (Patel et al., 1987). *connectin*, welches, wie auch *fasIII* für ein Zelladhäsionsmolekül kodiert, wird von *hh* aktiviert und in elf Zellgruppen entlang des Keimstreifs exprimiert. Diese Zellgruppen befinden sich immer im anterioren Teil der Segmente des viszerale Mesoderms (Nose et al., 1992), das heißt in dem Bereich des viszerale Mesoderms der unter dem Einfluß von *hh* und *en* steht (siehe auch Abb. 2.1). Muskelstrukturgene wie *myosin* werden ab dem Stadium 11 durch das MADS-Box-Protein Mef2 aktiviert.

Im Laufe der Entwicklung entsteht zudem eine Unterteilung entlang der antero-posterioren Achse des Bandes, da einige Gene nur in bestimmten Zellpopulationen des viszerale Mesoderms exprimiert werden. Hier sind vor allem die vier Homeobox-Gene *sex combs reduced*, *antennapedia*, *ultrabitorax* und *abdominal-A* zu nennen, die für die Ausbildung der Darmkonstruktionen wichtig sind (Bilder und Scott, 1998).

2.3 Die Fusion der somatischen Myoblasten

Die somatische Muskulatur bei *Drosophila melanogaster* besteht, aus vielkernigen Myotuben. Dies ist auch bei den Wirbeltieren der Fall. Im Gegensatz zu den Wirbeltieren, bei denen ein Muskel der Zusammenschluss aus mehreren Muskelfasern ist, bildet bei *Drosophila* jeder Myotubus einen eigenständigen Muskel. Um diesen Muskel zu bilden, wird zunächst das Mesoderm durch den Notch vermittelten Prozeß der lateralen Inhibition (siehe auch Abschnitt 2.4) in Progenitorzellen und fusionskompetente Myoblasten (FCM's) unterteilt. Aus den Progenitorzellen gehen nach einer Teilung die Founderzellen hervor (Carmena et al., 1995), welche für die Spezifität der einzelnen Muskeln verantwortlich und durch die Expression sogenannter Muskelidentitätsgene charakterisiert sind (reviewed in Baylies et al., 1998; Ruiz-Gómez, 1998; Frasch, 1999). Die Fusionen dieser Founderzellen mit den FCM's verläuft in zwei Stufen: In einem ersten Fusionsschritt fusionieren die Founderzellen mit den sie umgebenden FCM's und bilden so mehrkernige Muskelprecursor, welche dann durch weitere Fusionen zum fertigen Muskel werden (Rau et al., 2001).

Für diesen Fusionsprozeß müssen sich die Founderzellen und FCM's zunächst einander annähern. Hierfür sind vor allem zwei Faktoren, die beide zur Familie der Immunoglobuline gehören, essentiell: Dumbfounded/Kin of irregular chiasm-C (Duf/Kirre) auf der Seite der Founderzellen (Ruiz-Gómez et al., 2000; Strükelberg et al., 2001) und

Sticks and stones (Sns) auf der Seite der FCM's (Bour et al., 2000). In *sns* Mutanten finden keine Fusionen statt und es sind viele unfusionierte Myoblasten zu erkennen. Weitere Untersuchungen dieser Faktoren zeigten, daß die zur Untersuchung von *duf/kirre* eingesetzte Defizienz, bei der ein starker Fusionsphänotyp festgestellt werden konnte, sowohl *duf/kirre* als auch das paraloge Gen *irregular-chiasm-C/roughest* (*irreC/rst*) entfernt. Nur in dieser Defizienz konnte der Fusionsphänotyp beobachtet werden, während Mutanten in denen jeweils nur eines der beiden Gene mutiert ist, keinen Phänotyp zeigen (Strükelberg et al., 2001). Beide Faktoren scheinen daher redundant zu wirken. Im Gegensatz zu *duf/kirre* ist *irreC/rst* sowohl in den Founderzellen, als auch in den FCM's exprimiert.

Bindeassays in S2-Zellen haben gezeigt, daß Sns und Duf miteinander interagieren (Dworak et al., 2001) und daß in diesen Zellkulturen sowohl eine gespaltene als auch eine ungespaltete Form von Duf vorhanden ist (Chen and Olsen, 2001). Es konnte aber keine Interaktion von IrreC/Rst mit Duf/Kirre oder Sns festgestellt werden (Dworak et al., 2001). Hier könnte also ein anderer Faktor nötig sein, der den Bindepartner für IrreC/Rst in Analogie zur Bindung Duf/Kirre und Sns darstellen würde. Ein guter Kandidat hierfür war der ebenfalls zur Ig-Superfamilie gehörende Faktor Hibris (Hbs), welcher ausschließlich in der Zellmembran der FCM's zur gleichen Zeit wie Sns exprimiert ist. Hbs scheint aber redundant zu wirken, da Mutanten keinen Fusionsphänotyp zeigen und nur durch Überexpression eine Störung der Myoblastenfusion erreicht werden kann. Hbs zeigt allerdings ebenfalls nur eine Interaktion mit Duf/Kirre und nicht mit IrreC/Rst (Artero et al., 2001; Dworak et al., 2001).

Neben dieser komplexen Situation an der Membran der Founderzellen und FCM's sind verschiedene Interaktionspartner im Inneren der Zelle vorhanden (siehe auch Abb. 2.2). Auch hier sind mittlerweile einige Faktoren bekannt, die in einem oder beiden Zelltypen wirken. In *rolling pepples7/antisocial* (*rols7/ants*) mutanten Fliegen findet keine Myoblastenfusion nach der Bildung von Muskelprecursoren statt. Die FCM's orientieren sich zwar zu den Founderzellen, aber die Bildung des Präfusionskomplexes bleibt aus. Eine Interaktion von Rols7/Ants mit Duf/Kirre nicht aber mit Sns stimmt mit der Expression nur in Founderzellen überein. Das Rols7-Protein ist zunächst im Zytoplasma der Founderzellen verteilt, bevor es dann mit dem Beginn der Fusionen an den Bereichen der Zellmembran akkumuliert, an denen später die Fusionen stattfinden. Diese lokale Akkumulation findet in *duf/kirre*, *irreC/rst* Mutanten nicht statt, kann aber in *sns* Mutanten beobachtet werden (Chen und Olson, 2001; Menon und Chia, 2001; Rau et al., 2001). Auch in *kette* mutanten Embryonen werden die Muskelvorläufer zunächst noch gebildet. In den weiteren Fusionen werden die Membranen zwischen den Vorläuferzellen und den FCM's nicht mehr abgebaut,

wodurch der Fusionsprozeß stoppt (Schröter et al., 2004). Unter den in den FCM's spezifisch exprimierten Faktoren findet sich *Lame duck/Myoblast incompetent/Gleefull* (Lmd/Minc/Glee), ein Transkriptionsfaktor der die weitere Differenzierung der FCM's zu beeinflussen scheint (Duan et al., 2001, Furlong et al., 2001, Ruiz-Gómez et al., 2002). Viele andere Gene wie *myocyte enhancing factor2* (*mef2*) (Nguyen et al., 1994; Lilly et al., 1994, 1995; Bour et al., 1995; Taylor et al., 1995), *myoblast city* (*mbc*) (Rushton et al., 1995), *titin* (Zhang et al., 2000) oder *blown fuse* (*blow*) (Doberstein et al., 1997) sind in beiden Zelltypen exprimiert und in den entsprechenden Mutanten stoppt die Myoblastenfusion an unterschiedlichen Stellen (Übersichtsartikel: Dworak und Sink, 2002). Titin ist ein sehr großes Protein, welches wahrscheinlich in die Organisation der Aktinfilamente involviert ist. In Mutanten werden nur kleinere und dünnere Muskeln gebildet, da ein Teil der Fusionen nicht stattfindet (Zhang et al., 2000). Außerdem konnte eine Interaktion von Rols und Titin festgestellt werden (Menon und Chia, 2001). Mbc, ein Homolog des humanen DOCK180, interagiert mit dem Adapterprotein d-Crk und ist wahrscheinlich an der Reorganisierung des Aktinzytoskeletts beteiligt. In Mutanten sind keinerlei Fusionen zu erkennen (Erickson et al., 1997; Nolan et al., 1998).

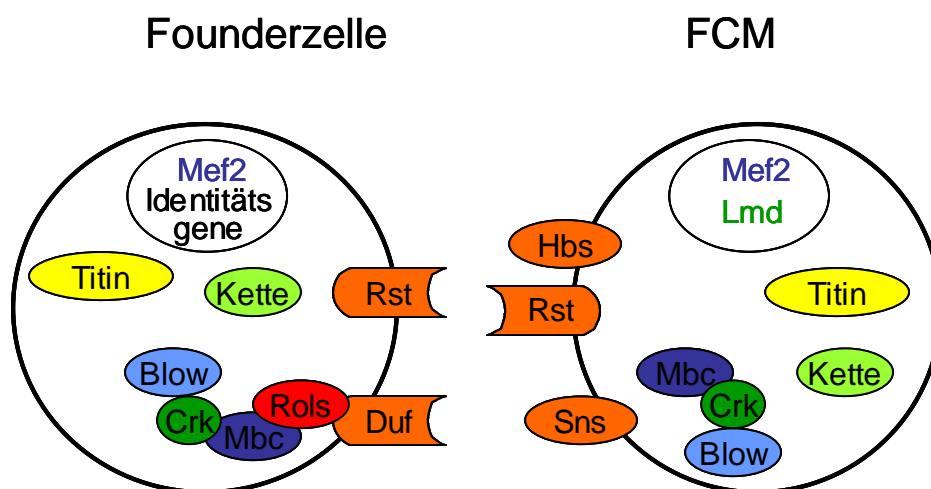


Abb. 2.2: Verteilung der fusionsrelevanten Proteine in Founderzellen und FCM's (verändert nach: Taylor, 2002). Einige der Faktoren, die bei der Myogenese eine Rolle spielen, sind in beiden Zellgruppen exprimiert (Mef2, Rst/IrreC, Blow, Crk, Kette, Titin und Mbc), während andere nur in den Founderzellen (Identitätsgene, Rols/Ants und Duf/Kirre) oder den FCM's (Sns, Lmd/Minc/Glee und Hbs) exprimiert werden.

Der für die somatische Muskulatur beschriebene Fusionsmechanismus kann in weiten Teilen auch auf die Fusionen in der viszeralen Muskulatur übertragen werden. In der zirkulären viszeralen Muskulatur mit einem nur zweikernigen Synzytium, können im Stadium

11 zwei unterschiedliche Zellpopulationen beobachtet werden. Die ventrale Zellreihe im Band des viszeralen Mesoderms, deren Zellen eine rechteckige Form aufweisen, ist durch die Expression des Gens *duf/kirre* gekennzeichnet. Die darüberliegenden, runderen Zellen hingegen exprimieren *sns*. Auch hier sind somit die beiden Interaktionspartner, die für die Zell-Zell Erkennung in der somatischen Myoblastenfusion essentiell sind, auf unterschiedliche Zellpopulationen verteilt. Diese beiden Zellpopulationen fusionieren zu jeweils zweikernigen Synzytien und bilden so die zirkuläre viszerale Muskulatur. Die Muskelfasern der longitudinalen viszeralen Muskulatur entstehen durch mehrere Fusionsschritte, indem sie während ihrer Wanderung nach anterior, mit FCM's aus dem Rumpfmesoderm fusionieren. Ein weiterer Hinweis zu Analogien während der Fusion in der somatischen Muskulatur zeigt sich darin, daß in *mbc*, *sns* und *duf/kirre,irreC/rst* Mutanten die Myoblastenfusion auch in der viszeralen Muskulatur gestört ist (San Martin et al., 2001, Klapper et al., 2002).

2.4 Die Rolle des Notch-Signalweges während der Embryonalentwicklung von *Drosophila*

Die Determination der Founderzellen und FCM's in der somatischen Muskulatur von *Drosophila* erfolgt durch einen in der Entwicklung von Organismen weit verbreiteten Signalweg, den Notch-Signalweg. Notch (N) ist ein Transmembranrezeptor, welcher lokale Zell-Zell-Kommunikationen vermittelt. Dieser Signalweg ist in allen bislang untersuchten Organismen vorhanden und dort meist in der Determination von Zellschicksalen involviert. Der Notch-Signalweg bewirkt dabei, daß von einer Reihe äquipotenter Zellen nur wenige Zellen zu einem bestimmten Zellschicksal ausdifferenzieren. Dies erfolgt durch den Prozeß der lateralen Inhibition, durch Apoptose oder durch Proliferation. Notch ist insofern ein außergewöhnliches Protein, da es zum einen an der Zellmembran als Rezeptor fungiert, zum anderen aber auch im Kern die Genexpression reguliert.

Die Hauptkomponenten des Signalweges bei *Drosophila* sind zum einen die Transmembranproteine Delta (Dl) und Serrate (Ser), die als Liganden fungieren (Rebay et al., 1991; De Cellis et al., 1993) und oft redundant wirken und zum anderen die downstream Effektoren *Suppressor of hairless* [*Su(H)*] (Fortini und Artavanis-Tsakonas, 1994) und die Gene des *Enhancer of split* [*E(spl)*]-Komplexes (Jennings et al., 1994). Nachdem der

jeweilige Ligand an den Notch-Rezeptor gebunden hat, wird dieser durch zwei unterschiedliche Enzyme prozessiert (siehe auch Abb. 2.3). Zunächst wird die extrazelluläre Domäne des Rezeptors durch die Metalloprotease *kuzbanian* (*kuz*) abgespalten (S2) (Lieber et al., 2002). Danach wird durch einen Multienzymkomplex, an dem unter anderem Presenilin beteiligt ist, die intrazelluläre Domäne von Notch (N^{intra}) proteolytisch freigesetzt, die dann in den Zellkern wandert. Dort wird der Su(H)-Co-Repressorkomplex durch einen Co-Aktivator-Komplex ersetzt, der N^{intra} enthält und nun an die regulatorischen Sequenzen von Notch-Zielgenen bindet und diese aktiviert. (Übersichtsartikel: Artavanis-Tsakonas et al., 1999; Lai, 2004). Hierdurch wird unter anderem die Expression der Gene des *E(spl)*-Komplexes aktiviert, die dann ihrerseits reprimierend auf den *achaete-scute* (*ac-sc*)-Komplex wirken (Heitzler et al., 1996).

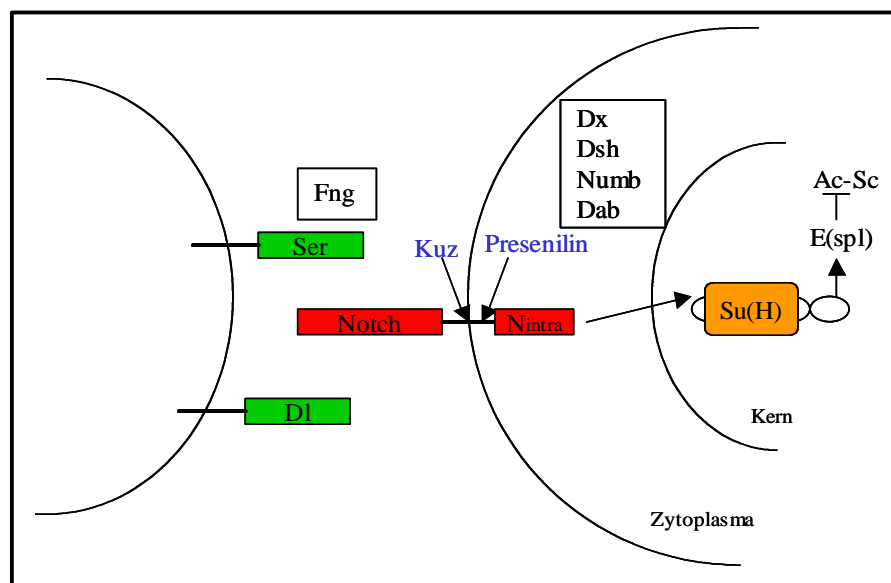


Abb. 2.3: Der Notch-Signalweg (verändert nach: Artavanis-Tsakonas et al., 1999). Der Rezeptor Notch (N) wird durch die Bindung an einen der beiden Liganden Delta (Dl) oder Serrate (Ser) aktiviert. Daraufhin wird der intrazelluläre Teil von Notch abgespalten und wandert in den Zellkern, wo es den Co-Repressor Hairless (H) aus dem Komplex mit Suppressor of hairless [Su(H)] verdrängt. Damit wird dieser zu einem Aktivator für die Transkription der bHLH Faktoren des Enhancer of split Komplexes [E(spl)]. Diese bHLH-Faktoren reprimieren dann die Expression der Gene des Achaete-Scute (Ac-Sc)-Komplexes. Fringe (Fng) begünstigt die Bindung von Notch an Dl. Die anderen gezeigten Faktoren beeinflussen diesen Signalweg entweder indem sie an der Prozessierung von Notch beteiligt sind, wie Kuzbanian (Kuz) und Presenilin, oder indem sie intrazellulär mit Notch interagieren (Deltex (Dx), Disheveled (Dsh), Disabled (Dab) und Numb) (weitere Erläuterungen siehe Text).

Viele Komponenten des Notch-Signalweges, die seine Wirkungsweise regulieren, sind mittlerweile bekannt. Die Glykosyltransferase Fringe erhöht die Fähigkeit des Rezeptors auf Delta zu reagieren, während die Affinität zu Serrate erniedrigt wird (Panin et al., 1997). Einige Faktoren wurden ermittelt, die mit der intrazellulären Domäne von Notch interagieren

und dort den Notch-Signalweg zum Teil positiv beeinflussen (Deltex, Disheveled, Disabled, Numb). Hairless hingegen ist ein sehr starker negativer Regulator des Notch-Signalwegs (Übersichtsartikel: Le Borgne und Schweissguth, 2003). Abgesehen von diesen direkt in den Signalweg involvierten Komponenten ist häufig die Anwesenheit gewebespezifischer Faktoren notwendig, um die Funktion des Notch-Signalweges zu gewährleisten.

Dieser, zunächst bei der Neurogenese beschriebene Prozeß ist auch bei der Determination der Founderzellen und FCM's der somatischen Muskulatur beteiligt. Im dorsalen Mesoderm werden Zellgruppen durch lokale Ras-Aktivierung in potentielle Founderzellen verwandelt, welche alle das proneurale Gen *lethal of scute (l'sc)* exprimieren. Durch den Notch vermittelten Prozeß der lateralen Inhibition wird die Expression von *l'sc*, auf eine Zelle, die später zur Progenitor Zelle wird, beschränkt (Buff et al., 1998; Carmena et al., 1998). Diese Progenitor Zelle teilt sich asymmetrisch zu Founderzellen (Carmena et al., 1995), welche durch die Expression von myogenen Genen charakterisiert sind (Baylies et al 1998; Paululat et al., 1999). In den anderen Zellen, in denen der Notch-Signalweg aktiv ist und die daher nicht zu Progenitorzellen werden, bindet der Su(H)-Transkriptionsfaktor an die regulatorischen Sequenzen des *E(spl)*-Genkomplexes und aktiviert dessen Transkription. Die bHLH-Proteine des *E(spl)*-Komplexes sind dann zusammen mit Groucho in der Lage, die Expression der Gene des *achaete-scute* Komplexes zu reprimieren (Heitzler et al., 1996).

Eine Mutation in einem der Gene des Notch-Signalweges, führt im somatischen Mesoderm zu einer erhöhten Zahl von Founderzellen und in Färbungen gegen Mhc oder β 3-Tubulin können starke Musterdefekte beobachtet werden. Diese Defekte im somatischen Mesoderm sind unabhängig von den neurogenen Phänotypen (Corbin et al., 1991).

2.5 Die Funktion von Rezeptor-Tyrosin-Kinasen während der Entwicklung von *Drosophila*

Eine zentrale Rolle bei der Regulation von zellulärer Differenzierung, Proliferation, Zellzyklen, zellulärer Migration, zellulärem Stoffwechsel und dem zellulären Überleben spielt der hochkonservierte Rezeptor-Tyrosin-Kinase (RTK) Signalweg. RTK's bestehen aus drei Domänen: einer extrazellulären Domäne die den Liganden bindet, einer einzelnen Transmembran-, sowie einer zytoplasmatischen, katalytischen Domäne. Die extrazelluläre Domäne enthält in der Regel eine Reihe von globulären Domänen, wie z.B. Immunoglobulin,

Fibronectin TypeIII, Cystein-reiche oder EGF ähnliche Domänen, die für die Bindung des Liganden verantwortlich sind (Übersichtsartikel: Hubbart und Till, 2000).

Nachdem der Rezeptor den für ihn spezifischen Liganden gebunden hat, ändert er seine Konformation und dimerisiert. Die Dimerisierung induziert die trans- und auto-Phosphorylierung an spezifischen Tyrosin-Domänen am C-terminalen zytoplasmatischen Ende des Rezeptors (Yarden und Ullrich, 1988; van der Geer et al., 1994). Die phosphorylierten Tyrosin-Reste werden von SH2-Adapterproteinen erkannt, welche die Verbindung zum intrazellulären Signalweg darstellen. Das Adapterprotein rekrutiert über die SH2-Domäne den Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor (GNRP), welcher in *Drosophila* u.a. durch das Gen *son of sevenless* kodiert wird (Olivier et al., 1993). Der so an die Plasmamembran verlagerte GNRP kommt in die Nähe der GTPase Ras. Ras liegt normalerweise in der inaktiven, GDP gebundenen Form in der Zelle vor. GNRP bewirkt den Austausch von GDP durch GTP. Das aktivierte Ras gibt das Signal durch Aktivierung anderer Proteine so lange weiter, bis daß das GTP wieder zu GDP hydrolysiert und Ras somit inaktiviert wird. Die GTP Hydrolyse wird durch das GTPase aktivierende Protein (GAP) bewirkt. Durch Ras werden Effektor-Proteine, wie die Proteinkinase C oder Raf aktiviert, welche nun selbst eine Reihe von Kinasen phosphorylieren. Schließlich gelangt die aktivierte Extracellular Regulated Kinase (ERK) in den Zellkern, wo sie unterschiedliche Transkriptionsfaktoren phosphoryliert, damit aktiviert und somit die Transkription unterschiedlicher Gene reguliert (reviewed in Schlessinger, 2000; Hubbart und Till, 2000; Rebay 2002).

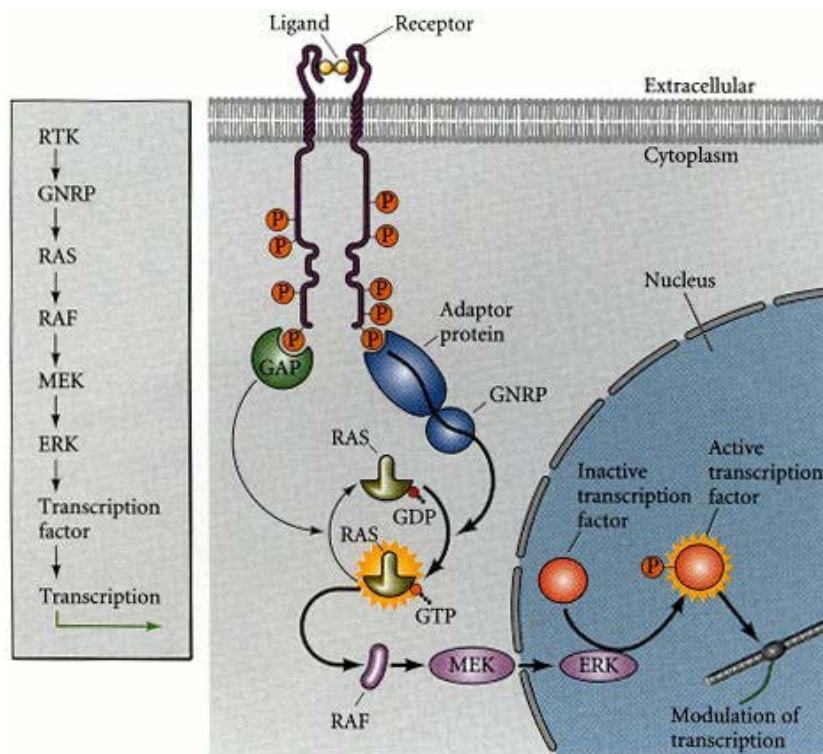


Abb. 2.4: Der Rezeptor-Tyrosin-Kinase (RTK)-Signalweg. Durch die Bindung an den extrazellulären Liganden dimerisiert der Rezeptor, was zur Autophosphorylierung bestimmter Tyrosine auf der zytoplasmatischen Seite führt. Dies wird von Adaptor-Proteinen erkannt, welche nun ihrerseits das Protein GNRP rekrutieren. Dadurch erfolgt ein Austausch des Ras gebundenen GDP's zu GTP. Bis GAP die Hydrolyse des GTP bewirkt und Ras dadurch wieder inaktiviert wird, werden eine Reihe von Kinasen phosphoryliert, die schließlich in der Aktivierung von ERK resultiert. ERK phosphoryliert nun Transkriptionsfaktoren, die dadurch aktiviert werden. Dies führt zu einer Änderung der Transkription in den Zellen (Abb. aus: Gilbert, Developmental Biology).

Da ein dauerhaft aktiver RTK Signalweg dramatische Auswirkungen haben kann, wie sich durch die häufige Beteiligung verschiedener, mutierter Komponenten des RTK-Signalweges bei der Bildung von Tumoren zeigt (Shih und Weinberg, 1982), muß seine Aktivität streng kontrolliert werden. Mechanismen, die die Regulation des Signalweges beeinflussen, bestehen aus negativen und positiven Feedback-Schleifen, sowie autoinhibitorischen Mechanismen. Außerdem hat sich gezeigt, daß Liganden-induzierte Endocytose der RTK ein weit verbreiteter Mechanismus ist, um die Wirkung des RTK-Signalweges zu beenden (Übersichtsartikel: Rebay, 2002).

In *Drosophila*, wie auch bei anderen Organismen, sind eine Reihe von Entwicklungsprozessen bekannt in denen RTK's eine wichtige Rolle spielen. Hierzu zählen unter anderem der Platelet-Derived Growth Factor (PDGF)-Rezeptor, der Fibroblast Growth Factor (FGF)-Rezeptor und der Epidermal Growth Factor-Rezeptor (EGFR). Der EGFR-Signalweg, welcher in *Drosophila* durch DER repräsentiert wird, spielt zusammen mit

heartless (*htl*) eine wichtige Rolle bei der Spezifizierung von somatischen Muskel-Vorläufern (Gabay et al., 1997; Buff et al., 1998; Michelson et al., 1998). Er ist aber auch in andere Entwicklungsprozesse, wie der Augenentwicklung (Perrimon und Perkins, 1997), der Flügelbildung (Simcox, 1997) oder der Oogenese (Nilson et al., 1999) involviert, wobei jeweils andere Liganden als Stimulus für die Aktivierung des Signalweges dienen. Unterschiedliche Entwicklungsprozesse nutzen also Teile desselben Signalweges. Welche Konsequenz ein Signal für die Zelle hat, hängt aber nicht alleine von dem Liganden ab, sondern resultiert außerdem aus dem Zusammenspiel der anderen in der Zelle vorhandenen Faktoren. Andere Regulationsmechanismen beinhalten die Aktion von sogenannten „Scaffold“-Proteinen, die gleichzeitig an mehrere Proteine binden und somit in der Lage sind, die Hauptkomponenten eines Signalweges von einem anderen, nah verwandten Signalweg abzutrennen. Ebenso gibt es Hinweise, daß auch die Stärke des Signals für die Entscheidung für einen Signalweg ausschlaggebend sein kann (Übersichtsartikel: Schlessinger, 2000). Das genaue Zusammenspiel dieser unterschiedlichen Mechanismen bleibt aber bislang unbekannt.

2.6 Problemstellung

Die Fusion der Myoblasten des viszeralen und somatischen Mesoderms zeigt auf molekularer Ebene große Ähnlichkeiten. Es gibt in beiden Geweben zwei Arten von Myoblasten, von denen die sogenannten Founderzellen, die Information für die korrekte Ausbildung des Muskels besitzen. Die übrigen fusionskompetenten Myoblasten (FCM's) sind nicht determiniert, um einen bestimmten Muskel zu bilden, sondern sie erhalten diese Spezifizierung erst durch die Fusion mit einer Founderzelle. In beiden Geweben sind die Founderzellen durch die Expression von *duf/kirre* und die FCM's durch die Expression von *sns* charakterisiert (San Martin et al., 2001; Klapper et al., 2002).

Die Determination der beiden Zelltypen in der somatischen Muskulatur wird durch den Prozeß der lateralen Inhibition bewirkt, der durch den Notch-Signalweg vermittelt wird und zur Bestimmung einer Progenitor Zelle aus einer Kompetenzgruppe führt (Carmena et al.,

1995). Die Grundlagen der Determinationsprozesse in der viszerale Muskulatur waren zu Beginn dieser Arbeit unbekannt. Daher war das Ziel dieser Arbeit, die Mechanismen zu klären, die zur Determination dieser beiden Zelltypen in der viszerale Muskulatur führen.

Aufgrund der vielen Gemeinsamkeiten im Fusionsprozeß zwischen den beiden Geweben sollte in einem ersten Ansatz nach Analogien zum Determinationsprozeß in der somatischen Muskulatur gesucht werden. Hierbei sollte vor allem die Relevanz von Faktoren des Notch-Signalweges für die Determination der Founderzellen und FCM's in der viszerale Muskulatur untersucht und Auswirkungen von Mutationen in den relevanten Genen analysiert werden. Darüber hinaus sollten Überexpressionsversuche mit dem *UAS-GAL4*-System durchgeführt werden.

Neben dieser Suche nach Gemeinsamkeiten in der Entwicklung des viszerale und somatischen Mesoderms sollte nach neuen, für das viszerale Mesoderm spezifischen Faktoren gesucht werden. Dazu sollte eine Kollektion von EMS-mutagenisierten Fliegen, die eine oder mehrere letale Mutation auf dem 2. oder 3. Chromosom tragen (Hummel et al., 1999a, b), nach Fliegenlinien durchgemustert werden, die einen Defekt allein in der viszerale Muskulatur, aber keine größeren Defekte in der somatischen Muskulatur aufweisen. Mit diesem Ansatz sollten neue Faktoren gefunden werden, die an der Determination der Founderzellen und FCM's des viszerale Mesoderms beteiligt sind und damit möglicherweise einen von der somatischen Muskulatur unabhängigen Mechanismus darstellen. Außerdem sollten Faktoren identifiziert werden, die einen allgemeinen Einfluß auf die Entwicklung des viszerale Mesoderms haben, aber wiederum nicht in die Entwicklung des somatischen Mesoderms involviert sind.

3. Material

3.1 Geräte

Semi-Dry Western-Blot-Apparatur	SemiPhor, Hoefer, San Francisco (USA)
CO ₂ – Inkubator	Revco-Inkubator, Labora, Upplands Väsby, Schweden
Digitalkamera	Polaroid
Elektrophoreseapparaturen	Werkstatt, Universität Marburg
Film-Entwicklungsmaschine	Fuji Hunt, FG 400E
Fotomikroskop	Axiophot, Leitz
Invers-Mikroskop	DM IL, Leica, Benzheim
Kapillarzyehgerät	Vertical Pipette Puller 720, Kopf
Konfokales Laser Scan Mikroskop	Confocal Laser Scanning Microscope (CLSM) Leica TCS SP2
Kühlzentrifuge	Heraeus Megafuge 1.0R
Mikrobiologische Sicherheitswerkbank	KR Biowizard 125, Vilppula, Finnland
Magnetrührer	Variomag Mono, H+P Labortechnik
Mikroinjektionsapparatur	5242 Hermle ZK 401, Eppendorf
Mikromanipulator	Leitz
PCR-Maschine	Personal Cycler, Biometra
Photometer	Ultrospec, Pharmacia
Schüttler	WT-12, Biometra

Stereomikroskop	Stemi SV6, Zeiss
Thermoblock	Driblock DB.2A, Techne, Cambridge
Tischzentrifuge	Biofuge 13, Heraeus
UV-Crosslinker	UV-Stratalinker 2400, Stratagene
UV-Transilluminator	Spektrolin TS-302
Videokamera und -printer	Biotech-Fischer

3.2 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien und Nährmedien wurden von den Firmen Fluka (Taufkirchen), Invitrogen/Gibco (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma (Taufkirchen) bezogen.

3.3 Enzyme

Alkalische Phosphatase	Roche, Mannheim
Klenow Enzym	Boehringer, Mannheim
Proteinase K	Roche, Mannheim
RNase A	Roche, Mannheim
RNAasin (RNase-Inhibitor)	Roche, Mannheim
Restriktionsendonukleasen	Roche, Mannheim Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
<i>Taq</i> DNA-Polymerase	Qiagen, Hilden Sigma, Taufkirchen
Trypsin	Sigma, Taufkirchen
T3 RNA-Polymerase	Roche, Mannheim
T7 RNA-Polymerase	Roche, Mannheim
T4 DNA-Ligase	Roche, Mannheim

3.4 Molekularbiologische Reagenzien und Reagenziensätze

BCIP	Roche, Mannheim
Bradford Protein Assay	BioRad Laboratories, München
DAB	Sigma, Deisenhofen
DABCO	Sigma, Deisenhofen
DIG DNA Labeling and Detection Kit	Roche, Mannheim
DIG RNA Labeling and Detection Kit	Roche, Mannheim
ECL ^{Plus} Westernblot Detection System	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Fluoromount G	Southern Biotechnology Associates, Birmingham (USA)
GFX PCR, DNA and Gel Purification Kit	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
High Range Rainbow Molecular Weight Marker	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Hyperfilm ECL	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Jetstar Plasmid Kit 2.0	GENOMED, Bad Oeynhausen
Mass Ruler DNA-Ladder, Mix	MBI Fermentas, St. Leon-Roth
NBT	Roche, Mannheim
Proteinaseinhibitoren Complete EDTA free	Roche, Mannheim
Polyvinylalkohol (PVA)	Sigma, Deisenhofen
PVDF-Membran ImmobilonP	Millipore, Schwalbach
TOPO TA Cloning Kit	Invitrogen, Karlsruhe
Transfektionsreagenz FuGENE6	Roche, Mannheim
Triton X-100	Roth, Karlsruhe
TSA TM Fluorescein System	Perkin Elmer Life Sciences, Boston (USA)
Tween 20	Sigma, Deisenhofen
Vectastain Elite ABC Standard Kit	Vector Laboratories, Burlingame (USA)

3.5 Antikörper und Seren

Im Folgenden sind die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper und Seren angegeben. Die jeweilige Verdünnung, in der die Antikörper für Fluoreszenzantikörperfärbungen eingesetzt wurden, ist in Klammern angegeben. Für immunhistochemische Nachweise wurden die Antikörper in der Regel doppelt so stark verdünnt. Die Verdünnungen der Cy2 und Cy3 gekoppelten Zweitantikörper beziehen sich auf die zur Lagerung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ angefertigte Verdünnung mit Glycerin (1:1).

Anti- β -Galaktosidase-Antikörper (monoklonal aus Maus; 1:1000)	Promega, Madison (USA)
Anti- β -Galaktosidase-Antikörper (polyklonal aus Kaninchen; 1:2500)	Biotrend, Köln; Cappel, Aurora, USA
Anti- β 3-Tubulin-Antikörper (polyklonal aus Kaninchen; 1:2500)	(Leiss et al., 1988)
Anti-Alk-Antikörper (polyklonal aus Kaninchen; 1:500)	(Lorén et al., 2003)
Anti-Delta-Antikörper (594.9B) (monoklonal aus Maus; 1:50)	Developmental Studies Hybridoma Bank
Anti-DIG-AP-Antikörper (polyklonal aus Schaf; 1:2000)	Roche, Mannheim
Anti-DIG-Antikörper (polyklonal aus Schaf; 1:1000)	Roche, Mannheim
Anti-dpERK-Antikörper (polyklonal aus Kaninchen; 1:500)	New England Biolabs, Beverly, USA
Anti-FasIII-Antikörper (monoklonal aus Maus; 1:5)	(Patel et al., 1987)
Anti-HA-Anikörper (polyklonal aus Kaninchen; 1:250)	Jackson Laboratories, West Grove (USA)
Anti-Jeb-Antikörper (polyklonal aus Kaninchen; 1:100)	(Weiss et al., 2001)
Anti-l'sc-Antikörper (polyklonal aus Ratte, 1:200)	(Martin Bermudo et al., 1991)
Anti-Lmd-Antikörper (polyklonal aus Kaninchen; 1:1000)	(Duan et al., 2001)

Anti-Mhc-Antikörper (monoklonal aus Maus; 1:1000)	MY 32, Sigma, Deisenhofen
Anti-Notch-Antikörper (monoklonal aus Maus; 1:10)	(Fuß und Hoch, 2002)
Anti-Tin-Antikörper (polyklonal aus Kaninchen 1:500)	(Bodmer, 1993)
Biotinyliertes Anti-Kaninchen IgG (aus Ziege; 1:500)	Vector Laboratories, Burlingame (USA)
Biotinyliertes Anti-Maus IgG (aus Pferd; 1:500)	Vector Laboratories, Burlingame (USA)
Biotinyliertes Anti-Ratte IgG (aus Pferd; 1:500)	Vector Laboratories, Burlingame (USA)
Biotinyliertes Anti-Schaf IgG (aus Kanninchen; 1:200)	Vector Laboratories, Burlingame (USA)
Cy2 gekoppelte Anti-Maus IgG (1:100)	Dianova, Hamburg
Cy3 gekoppelte Anti-Maus IgG (1:40)	Dianova, Hamburg
Cy2 gekoppelte Anti-Kaninchen IgG (1:100)	Dianova, Hamburg
Cy3 gekoppelte Anti-Kaninchen IgG (1:40)	Dianova, Hamburg
Normal Goat Serum	Vector Laboratories, Burlingame (USA)
Normal Horse Serum	Vector Laboratories, Burlingame (USA)

3.6 Fliegenstämme (*Drosophila melanogaster*)

Im Folgenden sind die in dieser Arbeit verwendeten Fliegenstämme mit ihrer Kurzbezeichnung und einer kurzen Beschreibung aufgelistet. Die mit dem Präfix BL gekennzeichneten Stämme wurden vom *Bloomington Drosophila Stock Center* (Indiana University, Bloomington, Indiana, USA; www.flystocks.bio.indiana.edu) bezogen. Fliegenstämme mit dem Präfix V stammen aus einer Kollektion EMS-mutagenisierter Fliegen (Hummel et al., 1999a und b). Die Beschreibung der Genotypen folgt der Nomenklatur nach Lindsley und Zimm (1992).

3.6.1 Balancerstämme

CSTM	$w^*; CyO/Sp; Sb/Ubx$ Multimarkerstamm zur kreuzungsgenetischen Lokalisation inserierter P-Elemente (zur Verfügung gestellt von A. Holz, Giessen)
w; Dr/SbTdlZ	$w^*; Dr/TM3, Sb, Df-LacZ$ Blau-Balancerstamm mit Markern für Chr. III (zur Verfügung gestellt von A. Holz, Giessen)
w; If/CyO_{hg-lacZ}	$w^*; Kr^{lf-1}/CyO_{hg-lacZ}$ Blau-Balancerstamm mit Markern für Chr. II (zur Verfügung gestellt von M. Affolter, Basel)

3.6.2 Defizienzen

bap^{Df} (<i>bagpipe</i>)	resultiert aus der Kreuzung von $Df(3R)e^{F1}$ und $Df(3R)e^{D7}$, welche gleichzeitig ein <i>tin</i> Re28-58 Rettungskonstrukt trägt (Zaffran et al., 2001)
BL 835 (<i>achaete-scute</i>)	$Df(1)sc19/C(1)DX, y^1 f^1; Dp(1;2)sc^{19}, fs(2)B^1 b^1 pr^1/In(2L)Cy, In(2R)Cy, Cy^1 dp^{lv} pr^1$ Defizienz entfernt den <i>achaete-scute</i> Komplex
Df (<i>Alk</i>)	$Df(2R)Alk\Delta 21$, Defizienz im Bereich 53C (Lorén et al., 2003)

DK3

Fliegenlinien mit einer Defizienz auf dem 3. Chromosom (Bloomington *Drosophila* Stock Keeping Center)

3.6.3 P-Element-Insertionen***bap-lacZ (bagpipe)***

P-Insertionslinie auf dem II. oder III. Chromosom, zeigt *lacZ*-Expression im zirkulären, viszeralem Mesoderm ab Stadium 10 (Azpiazu und Frasch, 1993; Zaffran et al., 2001)

BL 10576 (*jelly belly*)

$w^{67c23}; P\{w^{+mC}=lacW\}jeb^{k05644}/CyO,$
 $P\{sevRas1.V12\}FK1$

BL 11745 (*punt*)

$ry^{506} P\{ry^{+17.2}=PZ\}put^{10460}/TM3, ry^{RK} Sb^1 Ser^1$

BL 14578 (*mothers against dpp*)
croc-lacZ (crocodile)

$y^1; P\{y^{+mDint2} w^{BR.E.BR}=SUPor-P\}Mad^{KG00581}/CyO; ry^{506}$
 Reporterkonstrukt, zeigt Expression in den longitudinalen viszeralem Muskeln (Häcker et al., 1995)

Gbe-Su(H)-lacZ

Reporterkonstrukt zur Detektion des aktiven Notch-Signalweges (Furriols und Bray, 2001)

rP298-lacZ

P-Insertionslinie auf dem X-Chromosom, zeigt *lacZ*-Expression in allen Founder Zellen (Nose et al., 1992, Nose et al., 1998; Klapper et al., 2002)

3.6.4 Mutanten***Alk¹***

(Lóren et al., 2003)

BL 417 (*Suppressor of Hairless*)

$Su(H)^1/In(2L)Cy, In(2R)Cy, Cy^1 pr^1$

BL 1438 (*binou*)

$mwh^1 bin^{II} red^1 e^1/TM6B, Tb^1$

BL 3008 (*schnurri*)

$cn^1 shn^1 bw^1 sp^1/CyO$

BL 3015 (*Notch*)

$N^{55e11} rb^1/C(1)DX, y^1 w^1 f^1; Dp(1;2)51b/+$ (Brennan et al., 1997)

BL 3242 (*thick veins*)

$tkv^7 cn^1 bw^1 sp^1/CyO$

BL 3653 (<i>kuzbanian</i>)	$z^1 w^{11E4} / Dp(1;Y)y^+; Tp(1;2)TE34Cc, kuz^3 / CyO$
BL 5602 (<i>Delta</i>)	$Dl^{B2} e^1 / TM6C, Sb^1$
V1-V2	EMS Allele auf dem 2. Chromosom (Hummel et al., 1999a, b)
V3-V8	EMS Allele auf dem 3. Chromosom (Hummel et al., 1999a, b)
V9	EMS Allel auf dem 2. Chromosom (Hummel et al., 1999a, b), putatives <i>kuzbanian</i> Allel
<i>lame duck</i>	lmd^1 (Duan et al., 2001)

3.6.5 UAS- und GAL4-Stämme

<i>bap-GAL4</i>	GAL4-Treiberlinie im <i>bagpipe</i> Muster (zur Verfügung gestellt von M. Frasch, New York)
BL 1777 (<i>UAS-lacZ</i>)	$w^*; P\{w^{+mC} = UAS-lacZ.B\}Bg4-2-4b$
BL 5612 (<i>UAS-Dl</i>)	$w^{1118} P\{w^{+mC} = UAS-Dl.J\}TJ1$
BL 5830 (<i>UAS-Dl+N</i>)	$y^1 w^*; P\{w^{+mC} = UAS-Dl::N.act\}B2a2$
BL 6578 (<i>UAS-dnkuz</i>)	$w^*; P\{w^{+mC} = UAS-kuz.DN\}2$
<i>SG24-GAL4</i>	GAL4-Treiber auf dem II. Chr. im <i>twist</i> Muster (zur Verfügung gestellt von A. Michelson, Boston)
<i>UAS-Alk</i>	(Lorén et al., 2001)
<i>UAS-Alk^{act}</i>	$UAS-RPTP-Alk/UAS-RPTP-Alk; Es/CyO_{wg-lacZ}$ konstitutiv aktive Form von Alk (Englund et al., 2003)
<i>UAS-dnN</i>	(Rebay et al., 1993; Go et al., 1998)
<i>UAS-jeb</i>	(Weiss et al., 2001)
<i>UAS-l'scute</i>	$w; UAS-l'scute / CyO_{wg-lacZ}; TM6/MKRS$ (Hinz et al., 1994; zur Verfügung gestellt von T. Klein, Köln)
<i>UAS-Notch^{intra}</i>	$w; UAS-N^{intra} / CyO_{wg-lacZ}; TM6/MKRS$ (Lieber et al., 1993; zur Verfügung gestellt von T. Klein, Köln)

3.6.6 Sonstige

Oregon R	Wildtypstamm, Laborzucht der Arbeitsgruppe Renkawitz-Pohl, Marburg
white	w^{1118} Transformationsstamm; Laborzucht der Arbeitsgruppe Renkawitz-Pohl, Marburg

3.7 Bakterienstämme (*Escherichia coli*)

DH5α	<i>supE44</i> , $\Delta lacU169$ ($\Phi 80 lacZ \Delta M15$), <i>hsdR17</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>relA1</i>
-------------------------------	---

3.8 Plasmide

pBluescript IIS+	Klonierungsvektor, Stratagene, Heidelberg
pCR II-TOPO	Klonierungsvektor, Invitrogen, Karlsruhe
pUAST	(Brand und Perrimon, 1993)
pGATB	promotorfreier GAL4-Vektor (Brand und Perrimon, 1993)
pCHABΔSal	Transformationsvektor für <i>Drosophila melanogaster</i> , (Thummel et al., 1988)
pπ25.7wc	Helferplasmid für die P-Element-Transformation, das die codierende Sequenz für die P-Element-Transposase enthält (Karess und Rubin, 1984)
BACR43I04	BAC-Klon zur Amplifikation der <i>sns</i> -Promotor Region
pcDNA3	Säugetier-Expressionsvektor, Invitrogen, Karlsruhe
pIRES	Säugetier-Expressionsvektor, Stratagene, La Jolla (USA)

pIRES-dnAlk^{mouse}

Säugetier-Expressionsvektor mit Teilen der extrazellulären und Transmembran-Domäne des murinen Alk (bp 428-3732, kloniert über *Not I* und *Sph I*; zur Verfügung gestellt von R. Palmer, Umea, Schweden)

pcDNA3-Alk^{FL}

Säugetier-Expressionsvektor mit kompletter cDNA von *Drosophila* Alk kloniert über *Not I* und *Xba I* (zur Verfügung gestellt von R. Palmer, Umea, Schweden)

pcDNA3-RPTP-Alk

Säugetier-Expressionsvektor mit aktivierter Form von Alk (dimerisierte Form) kloniert über *Eco RI* und *Xba I* (zur Verfügung gestellt von R. Palmer, Umea, Schweden)

pcDNA3-Alk^{EC}

Säugetier-Expressionsvektor mit extrazellulärer Domäne von Alk kloniert über *Not I* (zur Verfügung gestellt von R. Palmer, Umea, Schweden)

pEMSVscribe-MyoD

Säugetier-Expressionsvektor mit kompletter cDNA des humanen MyoD kloniert über *Eco RI* (zur Verfügung gestellt von B. Winter, Braunschweig; Davies et al., 1987)

3.9 Synthetische Oligonukleotide

In PCR-Reaktionen oder Sequenzierungsreaktionen werden die synthetischen Oligonukleotide als Initiatoren (Primer) genutzt. Sie wurden von der Firma MWG-Biotech (Ebersberg) bezogen. Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide sind im folgenden aufgeführt.

lethal of scute RNAi2 Sense	CCGCCGATGAAAGTAGCAACGATG
lethal of scute antisense	CGAGTAGCTCCTCGTCATCTGGCT
sns sense 2 Not	GCCATTGGGCTGGCTGGTTCCTTG
sns vor spe S	CCAAGCCAGCAGTTTGAGGCGGG
sns nach spe AS	GTCCGTTGCATCTGGAGGATAGGG
sns AS 2 Bcl II	GCTTGCAGAAGTGTGGGTGAACGG

3.10 Zell-Linien

C2C12	Myoblasten Zell-Linie aus der Maus (zur Verfügung gestellt von B. Winter, Braunschweig; Yaffe und Saxel, 1977; ATCC-Nr.: CRL-1772)
C3H10T1/2	Fibroblasten Zell-Linie aus der Maus (zur Verfügung gestellt von B. Winter, Braunschweig; Renzikoff et al., 1973; ATCC-Nr.: CCL-226)

3.11 Auftragsarbeiten

Sequenzierarbeiten wurden bei der Firma Seqlab GmbH, Göttingen in Auftrag gegeben.

4. Methoden

I. Präparation und Analyse von DNA

4.1 Herstellung chemisch kompetenter Zellen

(Sambrook et al., 1989)

SOB-Medium:	2 % (w/v) Bactotrypton
	0,5 % (w/v) Hefeextract
	10 mM NaCl
	2,5 mM KCl
	10 mM MgCl ₂
	10 mM MgSO ₄
RF1:	10 mM RbCl ₂
	50 mM MnCl ₂
	30 mM KCl
	10 mM CaCl ₂
	15 % (w/v) Glycerin
	pH 5,8
RF2:	10 mM MOPS (pH 6,8)
	10 mM RbCl ₂
	75 mM CaCl ₂
	15 % (w/v) Glycerin
	pH 8

250 ml SOB-Medium wurden mit 2,5 ml einer frischen *E. coli* Kultur (1:100) angeimpft und unter Schütteln bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5-0,6 kultiviert. Danach wurden die Zellen für 15 min auf Eis inkubiert und abzentrifugiert (4000 UpM, 4 °C, 10 min). Die Resuspension erfolgt in 80 ml eiskaltem RF1-Puffer mit anschließender Lagerung auf Eis für 15 min. Nach erneuter Zentrifugation (4000 UpM, 4 °C, 10 min) wurden die Zellen in 20 ml RF2-Puffer aufgenommen und wiederum 15 min auf Eis inkubiert. Diese kompetenten Zellen konnten entweder sofort zur Transformation eingesetzt oder in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei –80 °C gelagert werden.

4.2 Stammhaltung und Kultivierung von Bakterienstämmen

LB Medium (Luria-Bertani): 1 % (w/v) Bactotrypton
0,5 % (w/v) Hefeextrakt
85,5 mM NaCl

Die Bakterienanzucht erfolgte in Flüssigkulturen aus LB-Medium. Eine kurzfristige Stammhaltung wurde auf festen Agarnährböden (LB-Medium/1,5 % (w/v) Agar) durchgeführt. Diese können nach der Anzucht bei 37 °C für einige Wochen bei 4°C aufbewahrt werden. Die langfristige Stammhaltung erfolgte in einer frischen Flüssigkultur die mit 25% sterilem Glycerin vermischt und bei –80 °C aufbewahrt wurde.

4.3 Transformation chemisch kompetenter Bakterien

(Sambrook et al., 1989)

200 µl dauerkompetente Zellen (Kompetenz 10^7 - 10^9 Transformanten/µg DNA) wurden auf Eis aufgetaut und mit 1-10 µl Plasmid-DNA-Lösung versetzt. Nach 30 min Inkubation auf Eis wurden sie für 1,5 min einer Hitzeschockbehandlung bei 42 °C unterzogen und danach sofort wieder auf Eis gelagert. Dann wurden 0,8 ml LB-Medium zugegeben und zur Ausbildung der Antibiotikaresistenz 1 Stunde bei 37 °C auf dem Schüttler inkubiert. 100 µl des Ansatzes wurden abgenommen und auf entsprechenden LB-Selektionsplatten (Ampicillin 100 µg/ml, Chloramphenicol 200 µg/ml) ausplattiert. Der Rest des Ansatzes wurde kurz zentrifugiert (4000 UpM; 3 sec), der Überstand bis auf 100 µl abgenommen, die Zellen resuspendiert und ausplattiert. Die Inkubation erfolgte ü.N. bei 37 °C.

4.4 Präparation von DNA aus *E. coli*

4.4.1 Mini-Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* (alkalische Lyse)

(Birnboim und Doly, 1979)

S1-Puffer:	50 mM Tris/HCl (pH 8,0)
	10 mM EDTA
	100 µg RNase A/ml
S2-Puffer:	200 mM NaOH
	1 % (w/v) SDS
S3-Puffer:	2,6 M KAc/Essigsäure (pH 5,2)

3 ml LB-Medium (+ Antibiotikum; Ampicillin 100 µg/ml, Chloramphenicol 200 µg/ml) wurden mit einer Bakterienkolonie angeimpft und ü.N. bei 37 °C auf dem Schüttler inkubiert. 1,5 ml der Kultur wurden in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und zentrifugiert (13000 UpM, 5 sec). Nach Entfernen des Überstandes wurden die Zellen in 100 µl S1-Puffer aufgenommen und für 10 Minuten auf dem Schüttler resuspendiert. Durch Zugabe von 200 µl S2-Puffer und 5 minütiger Inkubation wurden die Zellen einer alkalischen Lyse unterworfen. Schließlich wurden 150 µl S3-Puffer zur Neutralisation zugegeben, leicht geschwenkt und für 5 Minuten bei 13000 UpM zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß gegeben und zur Fällung der Plasmid-DNA wurde 0,8 VT Isopropanol zugegeben. Die Plasmid-DNA wurde durch Zentrifugation (13000 UpM, 30 min, 4°C) pelletiert, 2 mal mit 70 % EtOH gewaschen, getrocknet und in 30 µl H₂O gelöst.

4.4.2 Midi-Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* (Genomed Jetstar, nach Angabe des Herstellers)

Um größere Mengen Plasmid-DNA zu erhalten wurden 50 ml LB-Medium (+ Antibiotikum; Ampicillin 100 µg/ml, Chloramphenicol 200 µg/ml) mit der entsprechenden Bakterienkultur angeimpft und ü.N. bei 37 °C auf dem Schüttler inkubiert. Diese Kultur wurde dann in einen 50 ml Falcon überführt und zentrifugiert (4000 UpM, 10 min, 4 °C). Der Überstand wurde verworfen, die sedimentierten Zellen in 4 ml E1-Puffer resuspendiert und schließlich durch Zugabe von 4 ml E2-Puffer unter leichtem Schwenken für 5 Minuten lysiert. Zur Neutralisation wurden 4 ml E3-Puffer zugegeben und durch 10 minütige Zentrifugation (6000 UpM, 4 °C) chromosomale DNA und Zelltrümmer präzipitiert. Der Überstand wurde auf eine zuvor mit 10 ml E4-Puffer equilibrierte Anionenaustauschersäule geladen. Nach dem Durchfluß des Plasmid-DNA-haltigen Überstandes wurde die Säule zweimal mit je 10 ml E5-Puffer gewaschen und dann die an die Säulenmatrix gebundene Plasmid-DNA durch Zugabe von 5 ml E6-Puffer eluiert. Durch Zugabe von 0,7 VT Isopropanol und Zentrifugation (13000 UpM, 30 min, 10 °C) wurde die DNA gefällt. Das Präzipitat wurde 2 mal mit 70 % EtOH gewaschen, getrocknet und in 50 µl H₂O aufgenommen.

4.4.3 Präparation genomischer DNA aus *Drosophila*

(Pirotta, 1988; Steller und Pirotta, 1986)

Extraktionspuffer:	100 mM Tris/HCl (pH 9,0)
	100 mM EDTA
	1 % (w/v) SDS

Zur Präparation von genomischer DNA aus adulten Tieren wurde 10 ätherisierte Fliegen in 100 µl Extraktionspuffer in einem Glashomogenisator mit einem Pistill homogenisiert. Für die Präparation aus Embryonen wurden diese mit etwa dem selben Volumen an Extraktionspuffer versetzt und ebenfalls homogenisiert. Dann schließt sich eine 20 minütige Inkubation bei 65 °C im Wasserbad an. Nach Zugabe von 14 µl 8 M KAc wurde der Ansatz 30 min auf Eis inkubiert und schließlich zentrifugiert (13000 UpM, 4 °C, 15 min). Der Überstand wurde in eine neues Reaktionsgefäß überführt und die DNA durch Zugabe von 0,5 VT Isopropanol und Zentrifugation (13000 UpM, 4 °C, 15 min) gefällt. Das Präzipitat wurde zweimal mit 70 % EtOH gewaschen, getrocknet und in 50 µl H₂O aufgenommen.

4.4.4 DNA-Präparation aus BAC-Klonen

Die Präparation von DNA aus BAC-Klonen erfolgte analog der Midi-Präparation von Plasmid DNA (siehe 4.4.2).

4.5 Gelelektrophorese von DNA in Agarosegelen

(Sambrook et al., 1989)

1 × TAE-Puffer:	200 mM Tris-Acetat (pH 7,7)
	10 mM EDTA
1 × TBE-Puffer:	90 mM Tris/HCl (pH 7,9)
	90 mM Borsäure
	2 mM EDTA
10 × Auftragspuffer:	0,5 % (w/v) Xylencylanol
	0,5 % (w/v) Bromphenolblau
	40 % (w/v) Glycerin in 1× TAE

Eine TAE-Lösung für analytische Gele bzw. TBE-Lösung für Gele aus denen anschließend die DNA isoliert werden sollte, wurde mit 0,8-2 % Agarose aufgekocht und nach dem Abkühlen auf ca. 60 °C mit Ethidiumbromid (0,5 µg/ml) versetzt. Dann wurde die viskose Lösung in Gelkammern der Größe 6 cm × 9 cm bzw. 8 cm × 12 cm gegossen. Als Laufpuffer diente 1 × TAE- bzw. 1 × TBE-Puffer. Vor dem Auftragen wurden die DNA-Proben mit 1/10 VT 10 × Auftragspuffer versetzt. Nach der elektrophoretischen Auftrennung bei 60-100 V Gleichspannung konnte die DNA durch Bestrahlung mit UV-Licht sichtbar gemacht werden. Dabei wurde die orangerote Fluoreszenz eines DNA/Ethidiumbromid-Komplexes beobachtet.

4.6 Aufreinigung von DNA-Fragmenten

4.6.1 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

(GFXTM PCR,DNA and Gel Band Purification Kit, Amersham Pharmacia Biotech)

Das gewünschte DNA Fragment wurde unter UV-Licht mit einem Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten, in ein Mikroreaktionsgefäß überführt und gewogen. Zu je 100 mg Agarosegel wurden 100 µl Capture-Puffer zugeben und für 10-15 min im 60 °C Wasserbad inkubiert bis das Gelstück aufgelöst war. Die Lösung wurde dann auf eine Glasfasermatrix-Säule gegeben und mindestens 1 min bei RT inkubiert. Die Säule wurde in ein Sammelgefäß gestellt und zentrifugiert (4000 UpM, 30 sec). Die im Sammelgefäß aufgefangene Flüssigkeit wurde verworfen und die säulengebundene DNA mit 500 µl Waschpuffer gewaschen und zentrifugiert (4000 UpM, 30 sec). Danach wurde zur weiteren Trocknung der Säule diese in ein neues Reaktionsgefäß überführt und wiederum zentrifugiert (13000 UpM, 1 min). Nach weiterer Trocknung bei RT für mindestens 15 min wurde die Säule wiederum in ein neues Mikroreaktionsgefäß überführt und zur Elution der säulengebundenen DNA 10-50 µl H₂O auf das Säulenmaterial gegeben. Nach 5 minütiger Inkubation wurde der Ansatz zentrifugiert (13000 UpM, 1 min) und die eluierte DNA im Mikroreaktionsgefäß aufgefangen.

4.6.2 DNA-Isolierung aus Lösungen

(GFXTM PCR, DNA and Gel Band Purification Kit, Amersham Pharmacia Biotech)

In H₂O gelöste DNA-Fragmente wurden in 500 µl Capture-Puffer gegeben und das Gemisch auf eine Glasfasermatrix-Säule gegeben. Nach 5-15 minütiger Inkubationszeit wurde die Flüssigkeit bei 3500 UpM für 1 Minute abzentrifugiert. Das anschließende Waschen und Eluieren erfolgte analog der DNA-Isolierung aus Agarosegelen (siehe 4.6.2).

4.6.3 Aufreinigen von DNA für die Injektion in Fliegen

(ELUTIP-d, Schleicher und Schuell)

Low Salt:

- 0,2 M NaCl
- 20 mM trisHCl (pH 7,4)
- 1 mM EDTA

High Salt:

- 1 M NaCl
- 20 mM trisHCl (pH 7,4)
- 1 mM EDTA

Um die für die Injektion vorgesehene DNA von kleinen Partikeln zu befreien, die später die Injektionsnadel verstopfen könnten, wurde die DNA vorher über Elutip-d-Säulen aufgereinigt. Eine Elutip-d-Säule wurde nah an der Spitze abgeschnitten und mit Hilfe einer Spritze mit 1 ml High-Salt Lösung gewaschen. Dann wurde mit 5 ml Low-Salt Lösung gewaschen bevor die DNA in 1 ml Low-Salt Lösung sehr langsam durch die Säule gedrückt wurde (1 Tropfen/10 sec). Nach einem weiteren Waschen mit 3 ml Low-Salt Lösung wurde die DNA mit 500 µl High-Salt Lösung von der Säule gelöst und das Eluat in einem Mikroreaktionsgefäß aufgefangen. Die DNA wurde durch Zugabe von 0,7 VT Isopropanol und Zentrifugation (13000 UpM, 30 min, 10 °C) gefällt. Das Präzipitat wurde 2 mal mit 70 % EtOH gewaschen, getrocknet und in 30 µl H₂O aufgenommen.

4.7 Photometrische Konzentrationsbestimmung

Nukleinsäuren haben eine maximale Absorption bei $\lambda=260$ nm und können aufgrund dieser Eigenschaft photometrisch quantifiziert werden. Unter Berücksichtigung folgender Parameter läßt sich aus der Absorption (optische Dichte; OD) die Konzentration der Nukleinsäure in $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ bei einer Quarzküvetten Dicke von 1 cm berechnen:

doppelsträngige DNA	$\text{OD}_{260} \times 50 \times \text{Verdünnungsfaktor}$
einzelsträngige DNA	$\text{OD}_{260} \times 33 \times \text{Verdünnungsfaktor}$
RNA	$\text{OD}_{260} \times 37 \times \text{Verdünnungsfaktor}$

4.8 Klonierungstechniken

4.8.1 Enzymatische Spaltung von DNA mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen erkennen spezifische, meist palindromische Nukleotidsequenzen und schneiden die DNA an einer definierten Position in einer solchen Sequenz. Dadurch entstehen 3'Hydroxyl- und 5'Phosphatgruppen. Die Aktivität der Enzyme ist so definiert, daß eine Enzymeinheit (Unit [U]) 1 μg λ -DNA in 1 Stunde bei 37 °C vollständig zerschneidet. Um zu berechnen, welche Enzymmenge eingesetzt werden muß, um die eingesetzte DNA vollständig enzymatisch zu spalten, kann folgende Formel angewand werden:

$$\text{Benötigte Enzymmenge (Units}/\mu\text{g DNA)} = \frac{48,5 \text{ kb (bp Lambda)} \times \text{Anzahl der Schnittstellen in der DNA}}{\text{Größe der DNA (bp)} \times \text{Anzahl der Schnittstellen in } \lambda\text{-DNA}}$$

In jedem Restriktionsansatz (20 μl) wurden 0,5-5 μg DNA mit einer entsprechenden Menge Restriktionsendonuklease und 1/10 VT 10 \times Reaktionspuffer für 2 h bei 37°C im Wasserbad inkubiert.

4.8.2 Dephosphorylierung von freien 5'-Enden

Beim Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen entstehen 5'-Phosphatenden die leicht mit den 3'-Hydroxyenden verestern können, so daß linearisierte Vektormoleküle religieren. Um dies zu vermeiden wurde die Vektor-DNA vor der Ligationsreaktion mit alkalischer Phosphatase behandelt. Hierbei wird die Esterbindung zwischen der Phosphatgruppe und dem C5-Atom des offenen Zuckerphosphatgerüsts gespalten. Somit kann eine Phosphodiesterbindung nur noch zwischen dem dephosphorylierten Vektor und dem angebotenen DNA-Fragment erfolgen.

Die Dephosphorylierung wurde nach vollständigem Verdau durch Versetzen des gesamten Ansatzes mit 1 U alkalischer Phosphatase und 1/10 VT Reaktionspuffer und einer Inkubation für 1 Stunde bei 37 °C durchgeführt.

4.8.3 Ligation

Zur Ligation wurden 100-150 ng dephosphorylierte Vektor-DNA zusammen mit einem 3 bis 5 fachen molaren Überschuß des zu klonierenden DNA-Fragmentes eingesetzt. Zu der DNA wurden 1 U T4-DNA-Ligase und 1/10 VT 10 × Ligationspuffer gegeben. Die Ligation erfolgte in einem Endvolumen von 20 µl ü.N. bei 16 °C.

4.8.4 Polymerase-Ketten-Reaktion

(Saiki et al., 1988, Qiagen, Stratagene nach Angaben des Herstellers)

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR) wird verwendet um ein bestimmtes DNA-Fragment zu amplifizieren. Synthetisch hergestellte Oligonukleotide, die komplementär zum 5' bzw. 3' Ende des zu amplifizierenden DNA-Fragmentes sind und sich an den entgegengesetzten Strängen der denaturierten DNA anlagern, dienen der DNA-Polymerase als Primer und werden in großem Überschuß dem PCR-Ansatz zugegeben. Unter Verwendung der thermostabilen *Taq*-Polymerase werden die Primer komplementär zur Matritzen-DNA elongiert. Ein Syntheszyklus besteht aus drei Abschnitten: Im ersten Schritt wird die DNA bei 94 °C denaturiert. Darauf folgt die Anlagerung der Primer bei einer Temperatur zwischen 50 und 60 °C. Die Elongation erfolgt beim Temperaturoptimum der Polymerase bei 72 °C. Diese Schritte werden für eine PCR-Reaktion ca. 30 mal durchlaufen.

Vor dem ersten Zyklus wurde eine 10 min Denaturierung bei 94 °C und nach dem letzten Zyklus eine abschließende Elongation bei 72 °C für ebenfalls 10 min durchgeführt. Ein Reaktionsansatz umfaßt ein Gesamtvolumen von 50 µl und setzt sich aus folgenden Komponenten zusammen:

x µl Templat-DNA (5-50 ng)
1 µl 5'Primer (25 pmol/µl)
1 µl 3'Primer (25 pmol/µl)
1 µl dNTP-Mix (10 mM pro dNTP)
5 µl 10 × PCR-Puffer
0,2-1 µl *Taq*-DNA-Polymerase (5 U/µl)
ad 50 µl H₂O

4.9 Markierung von RNA- und DNA-Sonden

4.9.1 Markierung von RNA-Sonden mittels *in vitro* Transkription

Um DIG-markierte RNA-Sonden zu erhalten wurden zunächst 5 µg Plasmid-DNA stromabwärts der zu transkribierenden Fremd-DNA restriktionsenzymatisch linearisiert. Dabei wurden Enzyme verwendet, die entweder Blunt-Enden oder 5'Überhänge generieren. Nach dem Füllen wurde die Plasmid-DNA in 20 µl H₂O aufgenommen. Zur *in vitro* Transkription wurde 1 µg dieser DNA mit 2 µl DIG RNA-Labeling Mix (10 mM ATP, 10 mM CTP, 10 mM GTP, 6,5 mM UTP, 3,5 mM DIG-UTP), 2 µl 10 × Transkriptionspuffer, 1 µl RNasin (20U/µl) und 1 µl T3- oder T7-Polymerase in 20 µl Gesamtvolumen für 2 h bei 37 °C inkubiert.

4.9.2 Markierung von DNA-Sonden mittels PCR

(PCR DIG Labeling Mix, Roche)

Der PCR-DIG Labelling Mix wurde zur Herstellung von DIG-markierten Sonden für *whole mount in situ*-Hybridisierungen mit Hilfe der PCR verwendet. Hierdurch erhält man DNA-Sonden mit einer definierten Länge und Einzelstrangspezifität. Als Templat wurde entweder ein PCR Produkt verwendet oder die gewünschte Fremd-DNA in einem Vektor eingesetzt. Für die *in vitro* Transkription wurden in einem 50 µl Ansatz 100-150 ng Templat DNA, 100 pM Primer, 5 µl PCR DIG Labelling Mix, 5 µl PCR-Puffer und 1 µl *Taq*-Polymerase (20 U/µl) gemischt und einer Standard PCR-Reaktion unterzogen. Die Zyklenzahl wurde allerdings auf 60 Zyklen erhöht. Das PCR-Produkt wurde auf einem Gel kontrolliert.

Wenn als Templat ein Vektor eingesetzt wurde, wurden 5 µg Plasmid-DNA zunächst mit einem Restriktionsenzym geschnitten, welches die Plasmid-DNA stromabwärts der Fremd-DNA schneidet. Die so linearisierte Plasmid-DNA wurde gefällt und in 20 µl H₂O aufgenommen und dann für die *in vitro* Transkription eingesetzt.

4.9.3 Markierung von DNA Sonden mit Hilfe von Zufallsprimern

(DIG DNA Labeling and Detection Kit, Roche)

Eine weitere Methode zur Herstellung von DIG markierten DNA Sonden die keine Einzelstrangspezifität aufweisen besteht durch das „random priming“. Hierbei wird das DIG markierte Nukleotid Digoxigenin-11-UTP eingebaut. Dazu wurden 100-150 ng Templat DNA auf 15 µl mit H₂O aufgefüllt, 5 min bei 100 °C im Wasserbad denaturiert und anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Nach dem Auftauen werden 2 µl Hexanukleotidmix (1,56 mg/ml), 2 µl dNTP/DIG-11-UTP Markierungsgemisch (1 mM dATP, 1 mM dCTP, 1 mM dGTP, 0,65 mM dTTP, 0,35 mM DIG-dUTP) und 1 µl Klenow-Enzym (2 U/µl) zugegeben und ü.N. bei RT inkubiert.

4.9.4 Spot-Test DIG-markierter DNA-Sonden

(nach Roche)

DIG1:	0,1 M Tris/HCl (pH 7,5) 0,15 M NaCl
DIG2:	0,1 M Tris/HCl (pH 7,5) 0,15 M NaCl 0,5 % (w/v) Blockingreagenz
DIG3:	0,1 M Tris/HCl (pH 9,5) 0,1 M NaCl 0,05 M MgCl ₂

Der Spot-Test dient der Abschätzung der Qualität DIG-markierter Sonden. Hierzu wurden 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} und 10^{-4} Verdünnungen des Markierungsansatzes hergestellt und jeweils 1 µl dieser Verdünnungen auf eine Nylonmembran (Hybond N, Amersham) gespottet und durch UV-Bestrahlung kovalent vernetzt. Nach dem Äquilibrieren der Membran in DIG1-Puffer (1 min) wurde sie für 30 min in DIG2-Puffer geblockt. Dann wurde die Membran für 30 min in anti-DIG-Antikörperlösung (1:5000 in DIG2) inkubiert und 2 mal für 15 min in DIG1-Puffer gewaschen. Nach dem Äquilibrieren für 2 min in DIG3-Puffer wurde mit 1 ml Färbepuffer (4,5 µl NBT + 3,5 µl X-Phosphat/ml DIG3) inkubiert. Konnte nach 5 Minuten Inkubation im Dunkeln eine Färbung des 10^{-3} Spots beobachtet werden, war die Sonde ausreichend markiert und wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

II. Arbeiten mit *Drosophila melanogaster*

4.10 Stammhaltung und Zucht von *Drosophila melanogaster*

Maismehlagar:	60 % (w/v) Maismehl
	7,15 % (w/v) Fructose
	1,2 % (w/v) Trockenhefe
	0,14% (w/v) Nipagin
	0,7% (w/v) Agar
	0,6 % (w/v) Propionsäure

Die Fliegen wurden in zylindrischen Plastikgefäßen mit einer Höhe von 8 cm und einem Durchmesser von 2,5 cm in Klimakammern bei 18 °C oder 24 °C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 70% gehalten. Die Flaschen wurden ca. 2 cm mit Zuchtmedium gefüllt und mit Trockenhefe bestreut, die als Nahrungsquelle und als Stimulans zur Eiablage für die adulten Fliegen diente. Zur Stammhaltung wurden die Fliegen alle 1-2 Wochen auf neue Flaschen gesetzt. Sollte eine Fliegenlinie zu Experimentierzwecken vermehrt werden, wurde die Frequenz der Umsetzung auf neue Flaschen erhöht.

4.11 *Drosophila*-Kreuzungen

Um virginelle, weibliche Fliegen für Kreuzungsexperimente zu erhalten, wurden Flaschen mit schlupfbereiten Puppen von allen adulten Tieren befreit. Da die Spermien der frisch geschlüpften männlichen Fliegen bei einer Umgebungstemperatur von 25 °C ca. 6 Stunden, bzw. 16 Stunden bei 18 °C benötigen, um sich vollständig zu entwickeln, können die in diesem Zeitraum abgesammelten weiblichen Fliegen als virginell angesehen werden. Sie wurden nun in frischen Zuchtflaschen mit den gewünschten Männchen gekreuzt und die Nachkommen mit den gewünschten Merkmalen vermehrt.

4.12 *Drosophila*-Embryonen Ablagen

Apfelsaft-Agar	25 % (w/v) Apfelsaft
	1,25 % (w/v) Saccharose
	2,5 % (w/v) Trockenhefe
	0,2 % (w/v) Nipagin
	2,7 % (w/v) Agar

Um Embryonen zu erhalten, wurden ca. 200-300 Fliegen in größeren Ablagegefäßen gehalten, die durch Apfelsaft-Agar-Schalen abgeschlossen wurden. Für geringere Fliegenmengen wurden Plastikgefäße (Höhe 7 cm; Durchmesser 1,5 cm) ca. 1 cm hoch mit Apfelsaft-Agar befüllt und mit Stopfen verschlossen. Auf dem mit ein wenig angerührter Hefe bestrichenen Apfelsaft-Agar sollten die Fliegen ihre Eier ablegen. Nach gewünschter Ablagezeit wurden die Apfelsaftschalen gegen frische ausgetauscht.

4.13 Fixierung von Fliegenembryonen

NaCl-Triton	120 mM NaCl 0,02 % (w/v) Triton X100
PBS	130 mM NaCl 10 mM Na ₂ HPO ₄ 2 mM KH ₂ PO ₄ 3 mM KCl pH 7,4
PBT	0,1 % (w/v) Tween 20 in PBS
F-PBS (Formalin-PBS)	4 % (w/v) Paraformaldehyd in PBT

Die *Drosophila* Embryonen wurden mit etwas NaCl-Triton von der Agar-Oberfläche abgespült und in einem Stahldrahtkörbchen gesammelt. Anschließend wurden die Eier mehrfach mit NaCl-Triton gewaschen. Das Dechorionisieren erfolgte nach dem Abgießen der NaCl-Triton-Lösung unter Lupenkontrolle in einer 1:1 Verdünnung von Klorix (Colgate Palmoliv, Hamburg) für 2-4 Minuten. Danach wurde durch mehrfaches Waschen der Embryonen mit NaCl-Triton das Klorix vollständig entfernt und die Embryonen mit einer abgeschnittenen Pipettierspitze in ein Eppendorf-Gefäß überführt.

Die entchorionisierten Embryonen wurden mit 500 µl Heptan und 500 µl F-PBS versehen und anschließend 15-20 Minuten unter Schütteln inkubiert. An der Phasengrenze von Heptan zu

F-PBS vermischen sich die Reagenzien und der fixierende Formaldehydanteil der Lösung wird mit Hilfe des Heptans durch die Vitellinmembran gebracht. Nach der Inkubation wurde zunächst die untere, wäßrige Phase, dann die obere Heptanphase entfernt und mit 1 ml Heptan gewaschen.

Zum Entfernen der Vitellinmembran wurde zu den Embryonen 500 µl Heptan und 500 µl Methanol gegeben und 5 Minuten kräftig geschüttelt. Hierbei wird durch das Methanol die Vitellinmembran zum Platzen gebracht und die devitellinisierten Embryonen sinken zu Boden, während die nicht-devitellinisierten Embryonen an der Phasengrenze verbleiben. Diese wurden mit der Lösung abgesogen und die verbliebenen, devitellinisierten Embryonen noch mehrfach in Methanol gewaschen. Bis zur weiteren Verwendung werden die Embryonen bei 4 °C aufbewahrt.

4.14 P-Element Keimbahntransformationen von *Drosophila*

(Rubin und Spradling, 1982; Spradling und Rubin, 1982)

4.14.1 Vorbereitung der Embryonen

3-5 Tage nach dem Schlüpfen wurden 200-300 *white*-Fliegen in Ablagegefäßen bei 18 °C gehalten die mit einer Apfelsaftagar-Schalen verschlossen wurden. Die Apfelsaftagar-Schalen wurden alle 30 Minuten gewechselt und die darauf befindlichen Embryonen sofort mit einem Pinsel in ein feinmaschiges Metallsieb überführt. Anschließend wurden die Embryonen mehrfach mit NaCl-Triton gewaschen, in einer 1:1 Verdünnung von Klorix in H₂O entchorionisiert und wieder mehrfach in NaCl-Triton gewaschen. Die entchorionisierten Embryonen wurden mit einem Pinsel auf einen rechteckigen Apfelsaftagar-Block überführt und mit Hilfe einer Präpariernadel mit dem anterioren Pol zur Blockkante hin ausgerichtet. Nun wurde ein mit Klebstoff (Klebstoff von 10 cm Tesa-Packband in Heptan gelöst) bestrichenes Deckgläschen leicht auf die Embryonen gedrückt, so daß sie auf dem Deckgläschen fixiert wurden. Um den Innendruck der Embryonen für die nachfolgenden Injektionen zu verringern, wurden die Embryonen 8-12 Minuten im Exikator über Kieselgel getrocknet. Um weiteres Austrocknen zu verhindern, wurden die Embryonen nun mit Voltalef-Öl überschichtet.

4.14.2 Mikroinjektion

Injektionspuffer: 1 mM NaHPO₄ (pH 7,4)
50 mM KCl

Die für die Mikroinjektion benötigte Injektionsnadel wurde aus einer Borosilikat-Glaskapillare (Ø 1,2 mm) mit Innenfilament hergestellt, die in einem Kapillarziehgerät manuell ausgezogen wurde. Die Injektionsnadel wurde dann mit dem Injektionsansatz befüllt, der sich wie folgt zusammensetzt:

Injektionsansatz: 0,5 µg/µl DNA (Elutip-d gereinigt)
0,5 µg/µl Injektionspuffer
0,5 µg/µl Helferplasmid pπ25.7wc

Vor dem Einfüllen in die Kapillare wurde der Injektionsansatz zentrifugiert (13000 UpM, 30 min, 4 °C) um störende Schwebeteilchen zu sedimentieren. Die befüllte Kapillare wurde mit dem Drucksystem der Mikroinjektionsapparatur verbunden und am Mikromanipulator befestigt. Unter dem Mikroskop (200 fache Vergrößerung) wurde die Kapillare am Deckgläschen abgebrochen, um sie zu öffnen. Dann wurde die Kapillare in den posterioren Pol des Embryo eingeführt und die DNA-Lösung injiziert. Embryonen, bei denen schon die Polzellen erkennbar waren, wurden durch seitliches aufreißen mit der Injektionsnadel abgetötet, da bei diesen keine Transformation der Keimbahn mehr möglich ist. Nachdem alle Embryonen injiziert wurden, wurde das Deckgläschen wiederum mit Voltalef-Öl beschichtet, in eine feuchte Petri-Schale mit Apfelsaftagar überführt und bei 25 °C bis zum Schlüpfen der Larven inkubiert. Die Larven wurden dann mit einer Präpariernadel abgesammelt und in Fliegenflaschen mit Zuchtmedium überführt. Diese wurden dann bis zum Schlüpfen der adulten Fliegen bei 25 °C inkubiert.

4.14.3 Selektion transformierter Fliegen (Klemenz et al., 1987)

Die injizierten DNA-Konstrukte enthielten unter anderem das *white*-Gen, welches die Selektion transformierter Fliegen aufgrund der resultierenden roten Augenfarbe ermöglicht. Da die Insertion der P-Elemente in der Keimbahn der injizierten Embryonen erfolgte, konnte diese Selektion erst in der folgenden G1-Generation beobachtet werden. Die injizierten Fliegen (G0-Generation) wurden direkt nach dem Schlüpfen abgesammelt und in

Einzelzuchten mit *white*-Fliegen gekreuzt. In den Nachkommen dieser Kreuzungen konnten die transformierten Individuen durch die orange bis rote Augenfarbe erkannt werden. Diese wurden nun wiederum einzeln mit *white*-Fliegen gekreuzt. Um Mehrfachinsertionen zu eliminieren wurden darauffolgend 3-5 virginelle, rotäugige Weibchen, in welchen cross-over stattfinden kann, mit *white*-Männchen gekreuzt. Dies wurde mindestens 3 mal wiederholt und dann die heterozygoten Tiere untereinander weitergekreuzt. Homozygote Tiere konnten an der dunkleren Augenfarbe erkannt werden und wurden zur Etablierung stabiler Linien weitergezüchtet.

4.15 Das *UAS-GAL4*-System

(Brand und Perrimon, 1993)

Das *UAS-GAL4* System ermöglicht die zeit- und gewebespezifische Expression von Genprodukten in *Drosophila*. Dieses System beruht darauf, daß die Expression des Hefetranskriptionsfaktors *GAL4* unter die Kontrolle eines Promotors gestellt wird, welcher in den gewünschten Geweben zur gewünschten Zeit aktiv ist. *GAL4* seinerseits aktiviert die Expression von Transgenen, die unter der Kontrolle des *GAL4*-responsiven *UAS*-Promotorelements (*upstream activating sequence*) stehen. Sowohl das *GAL4*- als auch das *UAS*-Konstrukt liegen in unterschiedlichen transgenen Fliegenstämmen vor. Durch die Kreuzung der beiden Linien werden sie in einem Embryo kombiniert und der Effekt der ektopischen Expression kann in den Nachkommen der Kreuzung beobachtet werden (siehe Abb. 4.1).

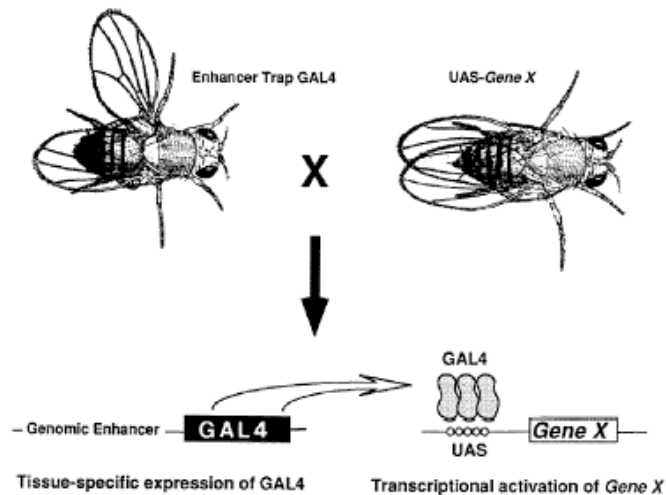


Abb. 4.1: Das UAS-GAL4-System. Für eine zeit- und gewebespezifische Expression von Genen werden zwei Fliegenlinien miteinander gekreuzt, die unterschiedliche Konstrukte tragen. Die eine Fliegenlinie trägt den Hefe-Transkriptionsfaktor *GAL4* unter der Kontrolle eines gewebespezifischen, genomischen Enhancers. Die zweite Fliegenlinie trägt das zu exprimierende Gen X unter der Kontrolle des *GAL4* responsiven UAS-Promotors. In den Zellen, in denen *GAL4* exprimiert wird, kann dieses über die UAS-Sequenz die Transkription des Gens X aktivieren (Abb. aus: Brand und Perrimon, 1993).

4.16 Letalitätstest

Um die Letalität der Nachkommen der *UAS-GAL4* Kreuzungen zu testen wurden homozygote Linien miteinander gekreuzt. Die Fliegen wurden in Ablagegefäße gegeben, die mit Apfelsaft-Agar-Schalen abgeschlossen wurden (siehe 4.12). Die Eiablagen wurden alle 24 Stunden gewechselt und für weitere 48 Stunden bei 24°C gelagert, um die Entwicklung zu Larven, soweit möglich, zuzulassen. Für jede Kreuzung wurden mindestens 1000 Nachkommen unter dem Stereomikroskop ausgezählt.

III. Histologische Methoden

4.17 Antikörperfärbung nach der „Avidin-Biotinylated Enzyme Complex“-Methode (ABC-Methode)

(Lawrence und Johnston, 1989)

DAB-Stammlösung: 25 mg/ml DAB in 50 mM Tris (pH 7,5)

H₂O₂-Lösung: 0,3 % H₂O₂ in PBT

NiSO₄-Lösung: 1 M NiSO₄

Das Grundprinzip der Antikörperfärbung nach der ABC-Methode besteht darin, daß ein unmarkierter Erstantikörper, der an ein Antigen bindet, durch einen biotinylierten Zweitantikörper mit dem „Vectastain ABC Standart Kit“ detektiert werden kann. Die an den Antikörper gebundenen Biotin-Moleküle bilden mit den Avidin-Molekülen, an die eine Meerrettich-Peroxidase gekoppelt ist, einen stabilen Komplex. Durch Zugabe von Wasserstoffperoxid (H₂O₂) als Katalysator, bilden die Peroxidase und das H₂O₂ einen Komplex, der chromogene Stoffe oxidieren kann. Bei Zusatz von Diaminobenzidin (DAB) erhält man daraufhin eine dunkle Färbung.

Nach dem Absaugen des Methanols von den fixierten und devitellinisierten Embryonen, wurden diese 3 mal in 1 ml PBT gewaschen. Das PBT wurde entfernt, der Erstantikörper in vom Antikörper abhängiger Konzentration und Menge zugegeben und über Nacht bei 4 °C unter Bewegung inkubiert.

Am nächsten Tag wurde der Erstantikörper von den Embryonen genommen. Daraufhin wurden die Embryonen 4 mal für jeweils 10 Minuten in 1 ml PBT unter Schütteln gewaschen. Um unspezifische Bindungen des prä-adsorbierten Zweitantikörpers zu verhindern, wurden die Embryonen 2 mal je 30 Minuten in 500 µl PBT + 10 µl Serum geblockt. Die Wahl des Serums richtete sich nach dem Tier, in dem der Zweitantikörper hergestellt wurde.

Die Prä-adsorption des Zweitantikörpers erfolgte parallel zur Inkubation des Erstantikörpers über Nacht. Hierzu wurden ca. 100-150 µl fixierte und devitellinisierte Wildtypembryonen mit PBT gewaschen. Dann wurden 300 µl des Zweitantikörpers 1:500 in PBT zu den Embryonen gegeben und für 2 Stunden bei RT auf dem Schüttler inkubiert.

Nach der Inkubation mit dem Zweitantikörper wurden die Embryonen wiederum 4 mal für je 10 Minuten in 1 ml PBT gewaschen. Nach dem ersten Waschgang wurden aus dem Promega-„Vectastain ABC Standart-Kit“ 5 µl Lösung A (Avidin) und 5 µl Lösung B (biotinylierte Peroxidase) in 500 µl PBT gegeben und auf dem Schüttler für 30 Minuten vorinkubiert.

Nach dem Waschen wurden 500 µl der A+B-Lösung (Avidin-Peroxidase-Komplex) den Embryonen zugeführt und diese 1 Stunde bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend erfolgten 4 Waschschrte à 10 Minuten in 1 ml PBT.

Nach dem Auftauen der DAB-Stammlösung und der H₂O₂-Lösung wurde die DAB-Stammlösung kurz zentrifugiert. Die Embryonen wurden in ein Blockschälchen mit 500 µl PBT überführt und gegebenenfalls zum Erhalten einer schwarzen Färbung 5 µl Nickelsulfatlösung zugegeben. Nach kurzem Schwenken wurden 10 µl DAB hinzugegeben, kurz inkubiert und die Färbereaktion durch Zugabe von 10 µl H₂O₂ gestartet. Die Färbung wurde unter dem Stereomikroskop beobachtet und bei genügender Intensität durch mehrfaches Waschen mit PBT gestoppt. Die Inaktivierung der abgesaugten Waschlösung, welche das karzinogene DAB enthielt, erfolgte in Klorix 1:1.

4.17.1 Fluoreszenz-Antikörperfärbung und Verstärkung mit dem TSA-Kit

Die Embryonen werden wie unter 4.13 beschrieben fixiert und nach dem rehydrieren in PBT ü.N. mit dem Erstantikörper bei 4 °C inkubiert. Dann wurde in 5 % Serum für eine Stunde geblockt und anschließend der Zweitantikörper zugegeben. Bei Antikörpern die eine starke Färbung zeigen wurde ein direkt Fluoreszenz gekoppelter Zweitantikörper verwendet. Die Embryonen wurden mit diesem für 2 Stunden bei RT inkubiert und anschließend nach mehrmaligem waschen mit PBT in Fluomount G eingebettet.

Bei Antikörpern, die bei den direkt Fluoreszenz gekoppelten Zweitantikörpern nur eine schwache Färbung zeigten, wurde mit dem TSA-System verstärkt. Hierzu wurde zunächst ein biotinylierter Zweitantikörper für 2 Stunden auf die Embryonen gegeben und nach mehrfachem Waschen (4 × 10 min) für 1 Stunde mit 500 µl vorinkubierter AB-Lösung versetzt. Nach wiederholtem Waschen (4 × 10 min) wurde das TSA-Gemisch zugegeben (0,5-2 µl Fluorescein in 100 µl „Amplification diluent“) und die Embryonen 30 Minuten bei Raumtemperatur gedreht. Anschließend wurde wiederum mehrfach gewaschen und in Fluomount G eingebettet.

4.18 *in situ*-Hybridisierungen an fixierten *Drosophila*-Embryonen

(Tautz und Pfeifle, 1989; O'Neil und Bier, 1994, modifiziert)

20 × SSC:	3 M NaCl 0,3 M Na ₃ Citrat
Hybridisierungslösung (HS):	50 % (w/v) Formamid 25 % (w/v) 20 × SSC 0,1 % (w/v) Heparin (50 mg/ml) 0,01 % (w/v) Tween 20
Färbepuffer:	100 mM NaCl 100 mM Tris/HCl (pH 9,5) 50 mM MgCl ₂ 1 mM Levamisol 0,1 % (w/v) Tween 20
Epon:	51,5 % (w/v) Epon 812 28 % (w/v) Epon Härter DDSA 19 % (w/v) Epon Härter MNA 1,5 % (w/v) Eponbeschleuniger DMP 30

Die Embryonen wurden wie unter 4.13 beschrieben fixiert und durch mehrmaliges Waschen mit PBT rehydriert. Anschließend wurden die Embryonen einer Proteinase K Behandlung unterzogen. Die Embryonen wurden in 990 µl PBT aufgenommen und nach Zugabe von 10 µl Proteinase K (5 mg/ml) für 1 Minute in der Hand geschwenkt. Nachdem die Embryonen abgesunken waren (ca. 30 sec.) wurde der Überstand sofort abgenommen und 2 mal mit 1 ml Glycin (2 mg/ml) gewaschen um die Reaktion zu stoppen. Anschließend wurden die Embryonen für 20 min in 1 ml F-PBS refixiert. Nach mehrmaligem Waschen (3 × 10 min in PBT, 1 × 10 min in PBT/HS 1:1, 1 × 10 min in HS) wurden die Embryonen 1-6 Stunden bei 45 °C (bei RNA-Sonden: 55 °C) im Heizblock prä-hybridisiert. Währenddessen wurden 1,5 - 4 µl DIG-markierte DNA-Sonde (1:10 in H₂O verdünnt) in 150 µl HS aufgenommen, 5 Minuten bei 100 °C denaturiert und danach kurz auf Eis gestellt. Die HS wurde von den prä-hybridisierten Embryonen genommen und durch die Sonde ersetzt. Die Hybridisierung erfolgte bei 45 °C (bei RNA-Sonden: 55 °C) für 16 – 36 Stunden.

Nach der Hybridisierung wurden die Embryonen 3 mal für 20 Minuten in vorgewärmter HS und 1 mal für 20 Minuten in HS/PBT bei 45 °C gewaschen. Es folgten weitere Waschschrte bei Raumtemperatur (3 × 20 min in PBT). Während der Waschschrte wurden fixierte Wildtypembryonen durch mehrfaches Waschen rehydriert und zur Absättigung unspezifischer Bindungen mit einer 1:100 Verdünnung des anti-DIG-AP-Antikörpers inkubiert. Die Embryonen wurden in 950 µl PBT aufgenommen, 50 µl des prä-adsorbierten Antikörpers zugegeben und 2 Stunden bei RT inkubiert. Nach viermaligem Waschen in PBT und

zweimaligem Waschen in Färbepuffer (jeweils 10 min) wurden die Embryonen in 1 ml Färbepuffer in ein Blockschälchen überführt. Die Farbreaktion wurde durch Zugabe von 3,5 µl X-Phosphat und 4,5 µl NBT gestartet und unter Lichtabschluß entwickelt. Bei ausreichender Färbeintensität die durch zwischenzeitliche Kontrolle unter dem Binokular festgestellt wurde, wurde die Reaktion durch mehrfaches Waschen in PBT gestoppt. Nach dem die Embryonen in einer Alkoholreihe dehydriert wurden, wurden die Embryonen entweder bei 4 °C gelagert oder in Epon eingebettet. Zur Aushärtung der Dauerpräparate wurden diese für mehrere Tage bei 60 °C gelagert.

4.18.1 Fluoreszenz *in situ*-Hybridisierung

Die Embryonen werden wie unter 4.13 beschrieben fixiert und durch mehrmaliges Waschen in PBT rehydriert. Nach einer Refixierung in F-PBS für 20 Minuten wurden die Embryonen wie unter 4.18 beschrieben prä-hybridisiert, mit der Sonde hybridisiert und gewaschen. Während der Waschschritte wurde der anti-DIG-Antikörper (aus Schaf) an gewaschenen und rehydrierten Wildtypembryonen prä-hybridisiert. Die Inkubation erfolgt in einer Endkonzentration von 1:1000 in PBT für 2 Stunden bei RT. Nach dem Waschen in PBT (4 × 10 min) wurde ü.N. bei 4 °C mit biotinyliertem anti-Schaf-Antikörper (1:200) inkubiert. Am nächsten Tag wurde 3 mal 10 Minuten in PBT gewaschen und während dieser Zeit 500 µl A + B-Lösung [5 µl Lösung A und 5 µl Lösung B (Promega „Vectastain ABC Standard-Kit“) in 490 µl PBT] prä-inkubiert. Diese vorinkubierte A+B-Lösung wurde dann für 1 Stunde auf die Embryonen gegeben. Nach dreimaligem Waschen in PBT für 10 Minuten wurden die Embryonen dann mit 100 µl Amplifikation diluent dem 0,5 – 2 µl Fluorescein (TSA-Fluorescein System, Perkin Elmer Life Sciences) zugegeben wurden, für 30 Minuten entwickelt. Nach mehrmaligem Waschen wurde ein Aliquot der Färbung unter dem Mikroskop kontrolliert. War die Hintergrundfärbung noch stark, wurden weitere Waschungen durchgeführt. Sobald der Hintergrund genügend reduziert war, wurden die Embryonen für 10 Minuten auf 70 °C erhitzt um das TSA zu inaktivieren. Nach weiteren 3 × 10 Minuten waschen in PBT wurden die Embryonen in Fluoromount G eingebettet oder einer Fluoreszenz-Antikörperfärbung (siehe 4.17.1) unterzogen, nachdem für 30 Minuten in 10 % Serum geblockt wurde.

4.19 Kutikula-Präparate

Die Embryonen wurden mit NaCl-Triton von der Agaroberfläche abgewaschen und in einem Stahldrahtkörbchen gesammelt. Nach mehrmaligem Waschen in NaCl-Triton werden die Embryonen in einer 1:1 Verdünnung Klorix/H₂O entchorionisiert und wieder gewaschen. Die Fixierung erfolgte in einer frisch angesetzten Mischung aus Glycerin und Eisessig (1:4) für ca. 75 Minuten im Wärmeschrank (60 °C). Danach wurden die Embryonen mit einem feinen Pinsel direkt auf einen Objektträger mit Hoyer's Medium überführt und mit einem Deckgläschen bedeckt. Das Klären der Präparate erfolgte für mindestens 24 Stunden bei 60 °C im Wärmeschrank.

Zur Herstellung von Hoyer's Medium wurden 30 g Gummi arabicum (sprühgetrocknet) über Nacht mit 50 ml H₂O gerührt. Am nächsten Tag wurden 200 g Chloralhydrat unter ständigem Rühren in kleinen Mengen zugegeben und schließlich die Mischung mit 20 g Glycerin versetzt.

IV Methoden der Zellkultur

4.20 Kultivierung von Säugetierzellen

RPMI-Zellkulturmedium:	0,0104 % (w/v) RPMI 1640 (Sigma, Deisenhofen)
	0,5 M HEPES pH 7,3
	0,015 % (w/v) NaHCO ₃
Wachstumsmedium (GM):	100 U/ml Penicillin
	100 µg/ml Streptomycin
	2 mM Glutamin
	10 % (v/v) Fetal calf serum (FCS; Invitrogen, Karlsruhe) in RPMI
Differenzierungsmedium (DM) für C3H10T1/2:	100 U/ml Penicillin
	100 µg/ml Streptomycin
	2 mM Glutamin
	3 % (v/v) Horse Serum (HS; Invitrogen, Karlsruhe) in RPMI
DM für C2C12-Zellen:	100 U/ml Penicillin
	100 µg/ml Streptomycin
	2 mM Glutamin
	10 % (v/v) HS in RPMI
Einfriermedium (EM):	5 % (v/v) Dimethylsulfoxid (DMSO) in DM

Die Zellen wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ in einem humiden Klima kultiviert. Wenn die Zellen ca. 90 % der Oberfläche des Kulturgefäßes bedeckten (90 % Konfluenz), wurden sie geteilt. Dazu wurde zunächst das Medium entfernt und die Zellen mit PBS gewaschen, um Reste des Mediums zu entfernen. Die Zellen wurden dann mit Trypsin (c = 0,25 % (w/v) in PBS) von der Oberfläche des Kulturgefäßes gelöst. Nach 2-3 Minuten im CO₂-Inkubator bei 37 °C konnte unter dem Mikroskop das Abrunden und Ablösen der Zellen beobachtet werden. Dann wurden 2-5 ml GM hinzugegeben und die Suspension mit einer Pasteurpipette auf- und abpipettiert, um eventuelle Zellaggregate aufzubrechen. Anschließend wurde die Suspension in ein Zentrifugationsgefäß pipettiert und bei 900 UpM für 2-3 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, je nach Größe des Pellets 1-10 ml GM-Medium zugegeben und die Zellen wiederum mit einer Pasteurpipette auf- und abpipettiert. Dann wurden die Zellen auf die neuen Kulturgefäße, in denen eine entsprechende Menge GM vorgelegt wurde, verteilt und weiterhin bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Um Zellstocks zu erhalten, wurden die Zellen nach dem Pelletieren in EM gelöst und als 1 ml Aliquots schrittweise abgekühlt und schließlich in flüssigem Stickstoff gelagert.

4.21 Transfektion der Säugetierzellen

4.21.1 Transfektion mit $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$

2 x HBS:	50 mM HEPES pH 7,05
	10 mM KCl
	12 mM Glucose
	280 mM NaCl
	1,5 mM Na_2PO_4

2×10^5 Zellen wurden in Zellkulturschalen mit einem Durchmesser von 60 mm ü.N. in 5 ml GM kultiviert. Am nächsten Tag wurde das GM durch DM ersetzt. 5 µg DNA wurden in 112,5 µl A. dest. aufgenommen und mit 12,5 µl 2M CaCl_2 versetzt. Diese Mischung wurde tropfenweise zu 125 µl 2 x HBS gegeben. Während des Zugabens der DNA-Lösung wurde durch das 2 x HBS mit Hilfe einer Pasteurpipette Luft geblasen. Diese Mischung wurde nun für 1 h inkubiert und dann tropfenweise zu den Zellen gegeben. Nach 24 Stunden wurde das Medium entfernt, die Zellen 2-3 mal mit RPMI-Medium gewaschen und schließlich frisches DM zugegeben.

4.21.2 Transfektion mit FuGENE6

(Roche, nach Angabe des Herstellers)

Transfektionsmedium (TM):	5 % (v/v) FCS
	2 mM Glutamin
	in RPMI

Da die C3H10T1/2 Zellen durch die Transfektion mit Calciumphosphat-Transfektionsmethode abgetötet wurden, wurde als alternatives Transfektionsreagenz FuGENE6 verwendet, welches ein Lipidtransfektionssystem darstellt. Hierzu wurden 10^5 Zellen auf 35 mm Platten ausgebracht und ü.N. kultiviert, so daß eine Konfluenz von 70-80 % erreicht wurde. Dann wurden 3 µl FuGENE6-Reagenz zu 97 µl serumfreiem Medium gegeben. Dem verdünnten Reagenz wurden 2 µg der zu transfizierenden DNA zugegeben und diese Mischung für 30 min inkubiert. Anschließend wurde der Transfektionsansatz zu den Zellen gegeben, welche mit 2 ml TM bedeckt waren. Am nächsten Tag wurde das Medium entfernt und DM zugegeben. Falls der transfizierte Vektor GFP als Reportergen trug wurde die Transfektionseffizienz unter dem Fluoreszenzmikroskop kontrolliert.

4.22 RIPA-Lyse von Säugetierzellen

RIPA-Puffer:	150 mM NaCl 10 mM Tris pH 7,2 0,1 % (w/v) SDS 1,0 % (v/v) Triton X-100 1 % (w/v) Doexycholeat 5 mM EDTA
Proteinaseinhibitoren:	1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) 10 mM Benzamidin 2 µg/ml Leupeptin
Phosphataseinhibitoren:	100 µM Natrium-Orthovanadat 10 mM p-Nitrophenylphosphat

Um die Proteine aus den Zellen für die Western-Blot-Analyse zu erhalten, wurden die Zellen aus der Zellkultur lysiert. Hierzu wurden zunächst das Medium von den Zellen entfernt und die Zellen 2-3 mal mit eiskaltem PBS gewaschen, um überschüssiges Medium zu entfernen. Dann wurden bei einer Kulturschale mit einem Durchmesser von 35 mm, 500 µl RIPA-Puffer, dem die Proteinase- und Phosphatase-Inhibitoren frisch zugegeben wurden, auf die Zellen pipettiert und diese mit einem Zell-Kratzer von der Oberfläche des Kulturgefäßes gelöst. Die Suspension wurde in ein Eppendorfgefäß gegeben und bei 4 °C und 13000 UpM für 15 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und bei –80 °C tiefgefroren.

4.23 Antigennachweis durch Immunhistologie an Säugetierzellen

Fixierlösung:	3 % (w/v) Formaldehyd 2 % (w/v) Saccharose in PBS
Blocking-Lösung:	2 % (v/v) Normal Goat Serum 0,4 % (v/v) Triton X-100 in PBS
Waschpuffer:	0,2 % (v/v) Triton X-100 0,2 % (v/v) BSA in PBS

Für Fluoreszenz-Antikörperfärbungen wurden 5×10^4 Zellen zunächst auf Deckgläschen bis zu einer Konfluenz von 70-80% in 12 well-Platten kultiviert und eventuell zur weiteren Differenzierung mit DM versetzt oder transfiziert. Wenn die Zellen die gewünschte Dichte, bzw. den gewünschten Differenzierungsgrad erreicht hatten, wurden sie mit Fixierlösung für 10 min bei RT fixiert. Danach wurden sie mit PBS, dem 0,1 M Glycin zugegeben wurde, gewaschen. Das Blocken der Zellen erfolgte in Blocking-Lösung für 15-20 min bei RT. Danach wurden die Zellen drei mal für 5 Minuten gewaschen. Die Inkubation mit dem Erstantikörper erfolgte in PBS, dem 0,1 % Triton X-100 zugefügt wurde, für eine Stunde bei RT oder ü.N. bei 4 °C. Dann wurden die Zellen wiederum fünfmal für 5 min gewaschen, der Cy2 oder Cy3 gekoppelte Zweitantikörper zugegeben und für mindestens 2 h bei RT inkubiert. Abschließend wurde wiederum fünfmal für 5 min gewaschen und in 2,5 % PVA/DABCO (siehe 4.23.1) eingebettet.

4.23.1 Herstellung des PVA-DABCO Einbettungsmediums

Zur Herstellung des Einbettungsmediums wurden zunächst 4,8 g Polyvinyl-Alkohol (PVA) mit 12 g Glyzerin vermischt. Dann wurden 12 ml A. dest. zugegeben und die Mischung unter ständigem Rühren bei RT ü.N. inkubiert. Am nächsten Tag wurden 24 ml 0,2 M Tris-HCl (pH 8-8,5) zugegeben und im Wasserbad bei 50 °C für 30 min gerührt. Dann wurden 1,25 g DABCO zugegeben, gut durchmischt und bei 2000 UpM für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde aliquotiert und bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

V Präparation und Analyse von Proteinen

4.24 Proteinbestimmung

(BioRad Laboratories, nach Angabe des Herstellers)

Die Menge an Protein, die in einer Probe enthalten war wurde mittels der Bradford Methode bestimmt. Hierzu wurde zunächst mit BSA eine Serie von Standards erstellt, die zwischen 5 und 150 µg/ml Protein in 1:5 verdünntem BioRad Protein-Assay Färbereagenz enthielten. Nachdem das Färbereagenz ohne BSA als Referenz genutzt wurde, wurde die Absorption dieser Standards bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen und aus den erhaltenen Werten eine Standardkurve erstellt. Nun wurden jeweils 10 µl der Proteinprobe mit 990 µl 1:5 verdünntem Färbereagenz versetzt, ebenfalls für 5 min inkubiert und bei $\lambda = 595$ nm die Absorption bestimmt. Anhand der Standardkurve konnte mit den so erhaltenen Werten die Menge an Protein in der Probe bestimmt werden.

4.25 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proteinen (SDS-PAGE)

(Laemmli, 1970)

Acrylamidlösung:	30 % (w/v) Acrylamid 0,8 % (w/v) Bisacrylamid
10 x SDS-Laufpuffer:	1,9 M Glycin 0,25 M Tris 1 % (w/v) SDS
2 x SDS-Probenpuffer:	50 mM Tris/HCl pH 6,8 20 % (v/v) Glyzerin 4 % (w/v) SDS 4 % (v/v) β -Mercaptoethanol 0,2 % (w/v) Bromphenolblau
4 x Tris-SDS-Puffer, pH 6,8:	0,5 M Tris/HCl pH 6,8 0,4 % (w/v) SDS
4 x Tris-SDS-Puffer, pH 8,8:	1,5 M Tris/HCl pH 8,8 0,4 % (w/v) SDS
Färbelösung:	40 % (v/v) Methanol 10 % (v/v) Essigsäure 1 % (w/v) Coomassie Brilliant Blau
Entfärbelösung:	40 % (v/v) Methanol 10 % (v/v) Essigsäure

In Anwesenheit von SDS, einem denaturierenden Reagenz, lassen sich Proteine in diskontinuierlichen Polyacrylamidgelen nach ihrem Molekulargewicht unabhängig von ihrer Ladung auftrennen. In dem verwendeten Laemmli-System besteht dieses Gel aus dem Trenngel, dessen Acrylamidkonzentration nach dem gewünschten Auftrennungsbereich gewählt wird (i.d.R zwischen 5 und 12,5 % Acrylamidlösung in 1 x Tris-SDS-Puffer pH 8,8). Dieses wurde nach dem Auspolymerisieren mit einem 5 %igem Sammelgel (5 % Acrylamidlösung in 1 x Tris-SDS-Puffer pH 6,8) überschichtet. Um die Polymerisation der Gele zu starten wurden den Mischungen 0,01 % TEMED und 0,015 % Amoniumpersulfat zugegeben.

Vor dem Auftragen wurden die Proben mit 1 VT 2 x SDS-Probenpuffer versetzt und bei 95 °C für 5 min denaturiert. Die Gelelektrophorese erfolgte in vertikalen Elektrophorese-Apparaturen bei 150-200 V für 1-2 Stunden.

Um die Proteine im Gel sichtbar zu machen, wurde das Gel 1-2 Stunden in Coomassie-Färbelösung geschwenkt. Durch das Waschen mit Entfärbelösung wurde überschüssiger Farbstoff entfernt und die Proteinbanden so sichtbar gemacht.

4.26 Western-Blot-Analyse

Semi-Dry Transfer-Puffer:	25 mM Tris 150 mM Glycin 10 % (v/v) Methanol
TBS:	10 mM Tris/HCl pH 7,7 150 mM NaCl
TBSTT:	0,05 % (v/v) Tween 20 0,2 % (v/v) Triton X-100 in TBS
TBS/MP:	5 % (w/v) Milchpulver in TBS

Nachdem die Proteine durch SDS-PAGE aufgetrennt wurden (siehe 4.25) wurde das Gel zunächst für 10 min in Semi-Dry Puffer inkubiert. Zum Aufbau des Blots wurden acht in Semi-Dry-Puffer getränkte Whatman-Papiere auf die Blot-Apparatur gelegt, gefolgt von einer

mit Methanol aktivierten und ebenfalls in Semi-Dry-Puffer geschwenkten ImobilonP Membran (Millipore), dem Gel und zum Abschluß wiederum acht getränkten Whatman-Papieren. Der Transfer erfolgte bei einer Stromstärke von 0,8-1,2 mA pro cm² Gel für 2 Stunden.

Nach Beendigung des Blotvorgangs wurde die Membran 10 min in TBS gewaschen und dann für 1 Stunde in TBS/MP geblockt. Nach weiterem Waschen mit TBSTT (2 mal 10 min) wurde der Erstantikörper ü.N. in TBS/MP bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran wiederum gewaschen (2 x 10 min TBSTT; 1 x 10 min TBS) und dann der Meerrettich-Peroxidase gekoppelte Zweitantikörper wiederum in TBS/MP für eine Stunde bei RT zugegeben. Nach 4 maligem Waschen in TBSTT (je 10 min) wurden die gebundenen Antikörper mit dem ECL^{Plus} Western Blot Detection Kit (Amersham) detektiert. Die Membran wurde nun auf einen Chemielumineszenz-sensitiven Film (Amersham High Performance Chemiluminescence Film) aufgelegt und der Film dann entwickelt.

5. Ergebnisse

I. Etablierung einer *GAL4*-Treiberlinie zur spezifischen Expression in den fusionskompetenten Myoblasten

Für die zeit- und gewebespezifische Expression von Genen im Mesoderm von *Drosophila melanogaster* mit dem *UAS-GAL4*-System (siehe 4.15) stehen verschiedene Treiberlinien zur Verfügung. Diese umfassen Treiber für das gesamte Mesoderm (*24B-GAL4*, Brand und Perrimon, 1993; *Mef2-GAL4*, M. Taylor nicht publiziert; *twist-GAL4*, Baylies und Bate, 1996), für das viszerale Mesoderm (*bap-GAL4*, Zaffran et al., 2001) oder speziell für die Founderzellen im viszeralen und somatischen Mesoderm (*rP298-GAL4*, Chen und Olson, 2001). Für die fusionskompetenten Myoblasten (FCM's) war keine Treiberlinie vorhanden, daher sollte diese im Rahmen der vorliegenden Arbeit erstellt werden. Da ebenfalls kein geeigneter *GAL4*-Vektor verfügbar war, der sich für die Transformation von Fliegenlinien eignet, wurde dieser zunächst auf der Grundlage des Transformationsvektors pCHAB Δ Sal (Thummel et al., 1988) generiert.

5.1 Generierung eines *GAL4*-Vektors

Zur Etablierung des *GAL4*-Vektors wurde zunächst aus dem Ausgangsvektor pCHAB Δ Sal (Thummel et al., 1988), mit Hilfe der Restriktionsendonukleasen *Xba* I und *Bam* HI, der für die β -Galaktosidase kodierende Bereich herausgeschnitten. In den so geöffneten Vektor wurde der, aus dem Vektor pGATB mit den selben Restriktionsendonukleasen herausgeschnittene, für *GAL4* kodierende Bereich ligiert (siehe Abb. 5.1).

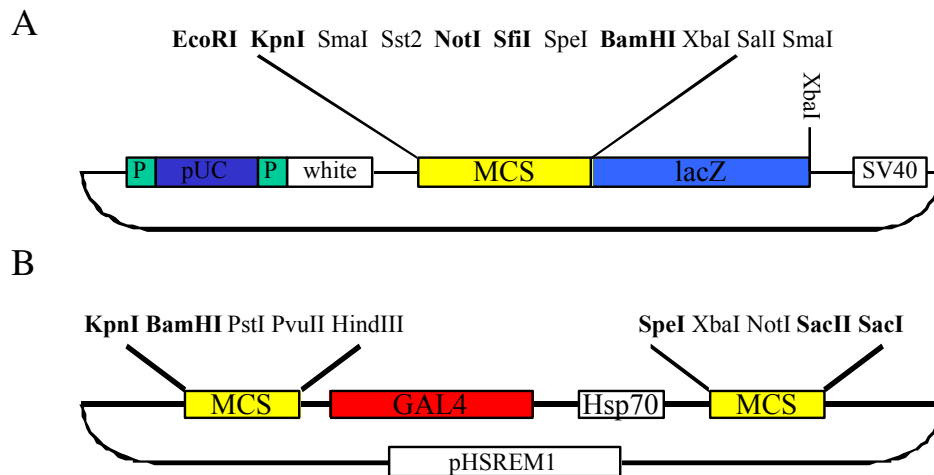


Abb. 5.1: Vektorkarte von pCHAB Δ Sal und pGATB. Gezeigt sind die Ausgangsvektoren für die Etablierung des pCHAB*GAL4*-Vektors. **A** pCHAB Δ Sal, **B** pGATB. Restriktionsendonukleasen, die nur in der MCS des Vektors schneiden, sind fett gedruckt. Restriktionsschnittstellen in den anderen Bereichen des Vektors sind nicht angegeben.

Es entstand der pCHAB*GAL4* genannte Transformationsvektor mit einer Größe von ca. 11700 bp, der, wie in Abb. 5.2 gezeigt, aufgebaut ist und für die Transformation von *Drosophila* eingesetzt werden kann.

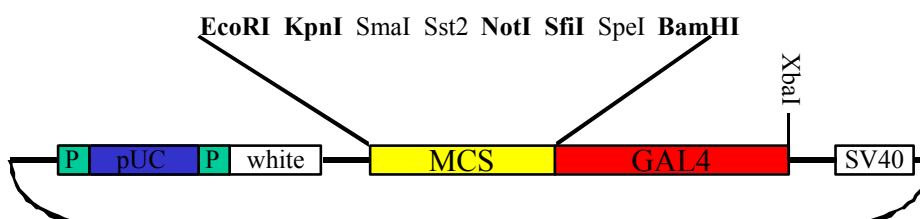


Abb. 5.2: Vektorkarte von pCHAB*GAL4*. Der *GAL4*-Transformationsvektor pCHAB*GAL4* wurde durch Ersetzen des für die β -Galaktosidase kodierenden Anteils des pCHAB Δ Sal-Vektors, durch den für *GAL4* kodierenden Bereich aus pGATB erhalten. Restriktionsendonukleasen, die nur in der MCS des Vektors schneiden, sind fett gedruckt, weitere Schnittstellen im Vektor sind nicht gekennzeichnet.

5.2 Ein 2,5 kb *sns* Promotorkonstrukt aktiviert die *lacZ*-Expression in den fusionskompetenten Myoblasten des somatischen und viszerale Mesoderms

Um einen geeigneten Promotor für die *GAL4*-Treiberlinie zu finden, wurde der Bereich stromaufwärts des Transkriptionsstarts von *sticks and stones* (*sns*) untersucht. *sns* wird nur in den FCM's sowohl des viszerale als auch des somatischen Mesoderms exprimiert (Bour et al., 2000) und schien daher ein guter Kandidat, um einen *GAL4*-Treiber für die FCM's zu generieren. Das stromaufwärts des Transkriptionsstartes von *sns* nächst gelegene, vorhergesagte Gen (computed gene, CG) ist 4,5 kb entfernt (www.flybase.bio.indiana.edu). Da der Promotorbereich noch nicht charakterisiert war, wurde angenommen, daß sich der Promotor von *sns* auf den Bereich zwischen den beiden Genen beschränkt. Daher wurden verschiedene Konstrukte zur Promotoranalyse aus diesem Bereich erstellt. Durch Sequenzanalysen konnten mehrere Bindestellen für die Transkriptionsfaktoren Myocyte enhancing factor 2 (Mef2; Lilly et al., 1994; Nguyen et al., 1994; Bour et al., 1995; Lilly et al., 1995; Taylor et al., 1995), Biniou (Bin; Zaffran et al., 2001) und Tinman/Bagpipe (Tin/Bap; Bodmer et al 1993; Frasch, 1995) innerhalb dieser 4,5 kb postuliert werden. Diese verteilen sich, wie in Abb. 5.3 gezeigt, über den putativen Promotorbereich. Für den Transkriptionsfaktor *Lame duck*, einem Faktor der essentiell für die Differenzierung der FCM's ist (Duan et al., 2001), konnte keine Bindestelle identifiziert werden (Sequenz der Bindestellen siehe Anhang 9.1).

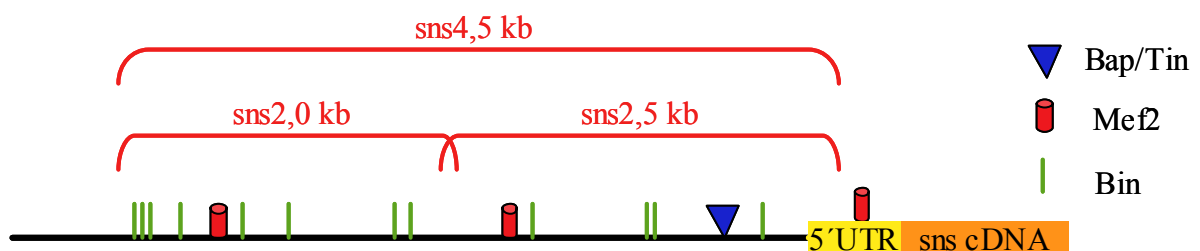


Abb. 5.3: Präsumptiver genregulatorischer Bereich von *sticks and stones* mit postulierten Transkriptionsfaktor-Bindestellen. Gezeigt ist der Promotorbereich sowie 5' flankierende Sequenzen von *sns* mit Bindestellen für Bagpipe/Tinman, Mef2 und Biniou. Die Klammern zeigen die Lokalisation der Promotorkonstrukte.

Zur Untersuchung des Promotorbereichs wurden drei unterschiedliche Konstrukte erstellt. Das erste Konstrukt umfaßt den gesamten putativen Promotorbereich von 4,5 kb (*sns*4,5 kb, Abb. 5.3, 5.4 C), sowie 94bp des 5'UTR. Da zum Zeitpunkt der Erstellung der Promotorkonstrukte der Translationsstart von *sns* noch nicht genau bestimmt war, fehlen 453 bp des 5'UTR. Gleichzeitig wurde dieser gesamte Promotorbereich in zwei Teile geteilt, wobei der weiter vom Transkriptionsstart entfernte, distale Bereich von ca. 2 kb Größe eine Bindestelle für Mef2 und acht Bindestellen für Bin enthält (*sns*2,0 kb, Abb. 5.3, 5.4 A), während in den proximalen 2,5 kb sowohl eine Bindestelle für Mef2, eine für Bap/Tin als auch vier Bindestellen für Bin enthalten sind (*sns*2,5 kb, Abb. 5.3, 5.4 B).

Die drei Konstrukte wurden mit denen in Abb. 5.4 angegebenen Primern amplifiziert. Da die PCR mit Wildtyp-DNA als Templat kein entsprechendes Amplifikat lieferte, wurde die PCR mit einem BAC-Klon (BACR43I04) als Templat wiederholt, wodurch Produkte in der richtigen Größe erhalten wurde. Diese Fragmente wurden zunächst in den Vektor pCR II-TOPO ligiert und aus diesem mit Hilfe der in Abb. 5.4 angegebenen Restriktionsschnittstellen ausgeschnitten. Die anschließende Klonierung in den Vektor pCHABΔSal erfolgte ungerichtet über dieselben Schnittstellen, mit denen die Fragmente aus dem pCR II-TOPO Vektor ausgeschnitten wurden. Konstrukte mit Inserts in der richtigen Orientierung wurden durch DNA-Sequenzierung identifiziert und für die weiteren Arbeiten eingesetzt.

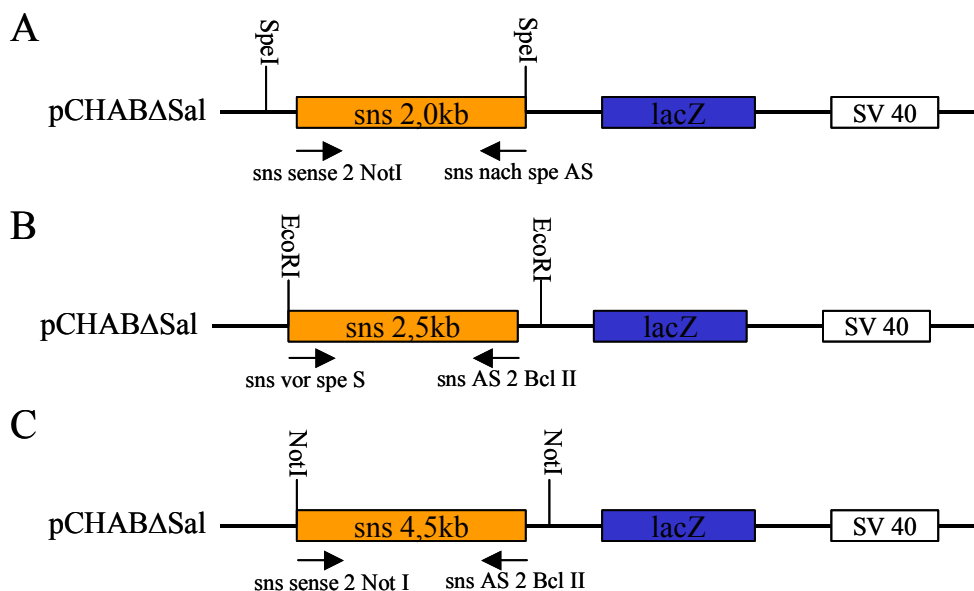


Abb. 5.4: *sns*-Promotorkonstrukte zur Identifizierung der für die Expression in den FCM's verantwortlichen Bereiche. Zur Identifizierung der für die Expression in den FCM's verantwortlichen Promotorbereiche von *sns* wurden drei Konstrukte etabliert. Zum einen wurde der gesamte Bereich zwischen *sns* und dem CG8746 über *Not* I in den Vektor pCHABΔSal kloniert (*psns*4,5-*lacZ*, C). Außerdem wurde dieser Bereich in zwei Teile geteilt, von denen ein 2,0 kb Fragment den distalen Bereich umfaßt und über *Spe* I kloniert wurde (*psns*2,0-*lacZ*, A), während das 2,5 kb Fragment, über *Eco* RI kloniert den proximalen, dem Transkriptionsstart von *sns* näher gelegenen Bereich umfaßt (*psns*2,5-*lacZ*, B).

Mit den so erhaltenen Konstrukten *psns2,0-lacZ* (Abb. 5.4 A), *psns2,5-lacZ* (Abb. 5.4 B) und *psns4,5-lacZ* (Abb. 5.4 C) wurden mittels Keimbahntransformation transgene Fliegenlinien etabliert. Die Analyse der Embryonen dieser Fliegenlinien mit anti- β -Galaktosidase Antikörperfärbungen zeigte, daß das Konstrukt *psns2,0-lacZ* (Abb. 5.4 A) keine Expression der β -Galaktosidase bewirkt (Daten nicht gezeigt). Hingegen zeigen Fliegenlinien, die das *psns2,5-lacZ*-Konstrukt tragen (Abb. 5.4 B) ein Expressionsmuster, welches vergleichbar mit der beschriebenen *sns* Expression ist (Bour et al., 2000). Es kann daher davon ausgegangen werden, daß dieses Konstrukt die Expression in den FCM's des somatischen und viszerale Mesoderms, ab Stadium 11 bis zum Ende der Embryogenese bewirkt (Abb. 5.5 A-D). Diese Expression war in drei unabhängigen Fliegenlinien zu beobachten. Ebenso zeigen drei unabhängige Fliegenlinien, die das *psns4,5-lacZ*-Konstrukt tragen, das volle Expressionsmuster (Abb. 5.5 E-H). Dabei ist die Expression deutlich stärker als in Embryonen, die das *psns2,5-lacZ*-Konstrukt tragen. In den distalen 2,0 kb des Promotorbereichs scheint daher ein Enhancer-Element lokalisiert zu sein, welches die Expression verstärkt. Ein weiterer Unterschied zwischen den Effekten des *psns4,5-lacZ* und *psns2,5-lacZ*-Konstrukt ist die, durch das größere Konstrukt bewirkte, zusätzliche Expression von *lacZ* im Gonadenmesoderm (Pfeil in Abb. 5.5 H), in dem *sns* normalerweise nicht exprimiert wird. Dies könnte daraus resultieren, daß ein Enhancerelement des stromaufwärts von *sns* lokalisierten CG8746 mit in dem Konstrukt vorhanden ist und die Expression im Gonadenmesoderm hervorruft.

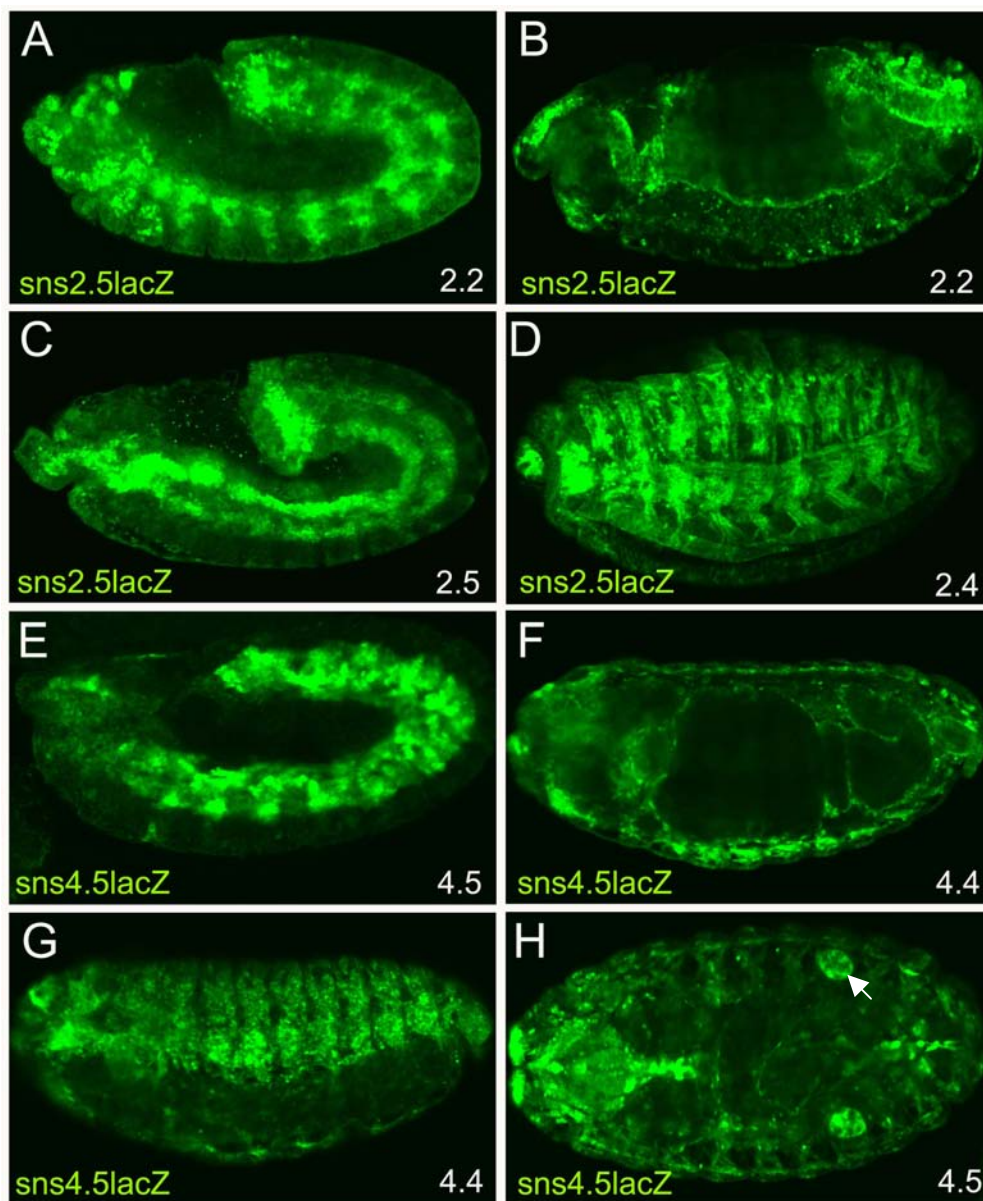


Abb. 5.5: Ein 2,5 kb DNA-Fragment stromaufwärts des Transkriptionsstartes von *sns* ist ausreichend, um die *lacZ*-Expression in den FCM's zu bewirken. Die Embryonen in allen Abbildungen sind, sofern keine anderen Angaben gemacht werden, mit dem anterioren Pol nach links und der dorsalen Seite nach oben ausgerichtet. Gezeigt ist die β -Galaktosidase Expression in Embryonen die *sns*-Promotorkonstrukte enthalten. Alle Färbungen wurden mit Verstärkung durch das TSA-Fluorescein-System durchgeführt. **A-D** Das *psns2,5lacZ*-Konstrukt zeigt in 3 unabhängigen Fliegenlinien (**A**, **B**: Linie 2.2; **C**: Linie 2.5; **D**: Linie 2.4) eine *lacZ*-Expression im Stadium 11 (**A**) und 12 (**C**) in den beiden Bändern der FCM's des viszeralen und somatischen Mesoderms. Diese bleibt bis zum Ende der Embryogenese sowohl im viszeralen (**B**) als auch somatischen (**D**) Mesoderm bestehen. **E-H** Auch das *psns4,5lacZ*-Konstrukt zeigt *lacZ*-Expression in den FCM's ab dem Stadium 11 (**E**) und das Protein kann bis zum Ende der Embryonalentwicklung beobachtet werden (**F**, **G**). Allerdings ist bei diesem Konstrukt eine zusätzliche Expression im Gonadenmesoderm zu erkennen (Pfeil in **H**). (**E**, **H**: Linie 4.5; **F**, **G**: Linie 4.4).

5.3 Die durch das *psns4,5-GAL4*-Konstrukt bewirkte β -Galaktosidase Expression ist translational reprimiert

Um schließlich eine Treiberlinie für die FCM's zu erhalten, wurde das 4,5 kb Fragment des *sns* Promotorbereichs, welches sich durch eine starke β -Galaktosidase-Expression in den FCM's auszeichnet (siehe Abschnitt 5.2) in den zuvor generierten pCHAB-*GAL4* Vektor (siehe Abschnitt 5.1) über die Restriktionsschnittstelle *Not* I kloniert (Abb. 5.6).

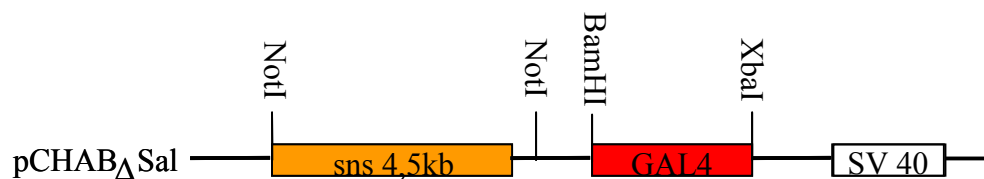


Abb. 5.6: Konstrukt für die Etablierung einer *GAL4*-Treiberlinie zur Expression in den FCM's. Das 4,5 kb Fragment des *sns* Promotorbereichs wurde in den Vektor pCHAB*GAL4* über *Not* I kloniert (*psns4,5-GAL4*).

Die richtige Orientierung dieses Konstruktes wurde durch DNA-Sequenzierung verifiziert und das Konstrukt anschließend zur Transformation eingesetzt. Homozygote *psns4,5-GAL4* Fliegen von 3 unabhängigen Linien, wurden mit Fliegen gekreuzt, die ein *UAS-lacZ*-Konstrukt (BL 1777) tragen. Die Nachkommen dieser Kreuzung tragen jeweils eine Kopie des *psns4,5-GAL4*-Konstruktes und eine Kopie des *UAS-lacZ*-Konstruktes. In den Zellen, in denen *GAL4* unter dem Einfluß des *sns* Promotors exprimiert wird, kann es über die *UAS*-Promotorelemente die Expression der β -Galaktosidase aktivieren.

Bei der Analyse der Embryonen die aus der Kreuzung resultieren, konnte eine β -Galaktosidase-Expression sowohl im somatischen, als auch im viszerale Mesoderm beobachtet werden. Diese Expression ist allerdings in frühen Stadien auf nur wenige Zellen beschränkt (Abb. 5.7 A-D, F) und konnte erst weit nach dem Ende der Fusionen in allen Zellen beider Gewebe festgestellt werden (Abb. 5.7 G). Dies war erstaunlich, da das gleiche Promotorfragment in der *sns4,5-lacZ*-Linie das volle Expressionsmuster schon in frühen Stadien zeigt (Abb. 5.5 E). Um zu testen, ob die Repression auf translationaler oder transkriptioneller Ebene stattfindet, wurden an den Embryonen *in situ* Hybridisierungen mit einer DIG-random markierten *lacZ*-Sonde, die mit pCHAB Δ Sal als DNA-Templat hergestellt wurde, durchgeführt (siehe Material und Methoden). Dabei konnte die *lacZ*-RNA ab dem Stadium 11 in allen FCM's des somatischen und viszerale Mesoderms detektiert werden (Abb. 5.7 E). Die Repression der β -Galaktosidase-Expression findet also auf der

translationalen Ebene statt. Somit kann das *psns4,5-GAL4*-Konstrukt zur Aktivierung von Genen in den FCM's des somatischen und viszerale Mesoderms verwendet werden.

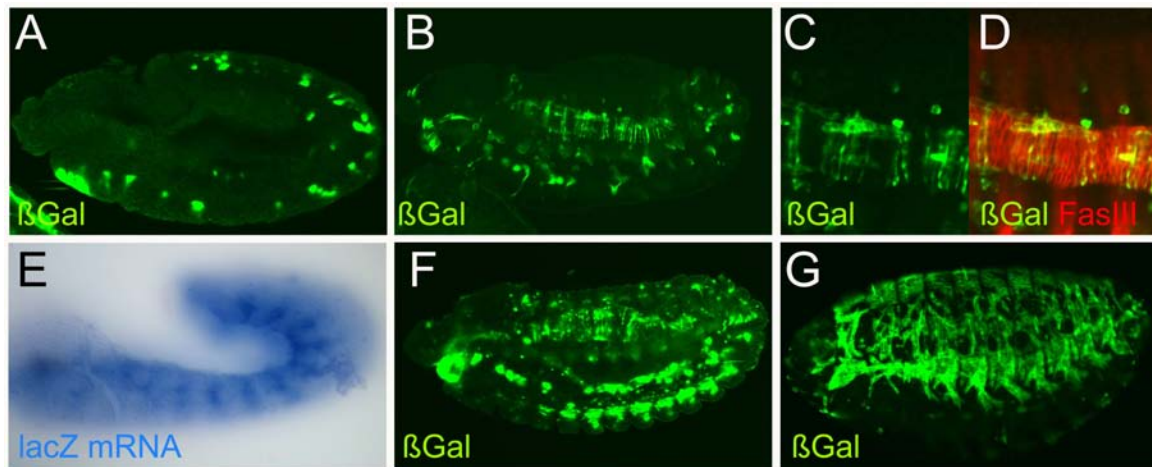


Abb. 5.7: Die β -Galaktosidase Expression in *sns4,5-GAL4>>UAS-lacZ* Embryonen ist translational reprimiert. Alle gezeigten Embryonen resultieren aus der Kreuzung von *sns4,5GAL4* Männchen mit *UAS-lacZ* Jungfrauen. Die β -Galaktosidase-Expression wurde durch Antikörperfärbung mit dem TSA-Fluorescein-System sichtbar gemacht (**A-D, F, G**). Das viszerale Mesoderm wurde durch eine Antikörperfärbung mit anti-FasIII-Antikörpern visualisiert (**D**). Zum Nachweis der *lacZ* mRNA wurde eine DIG-random markierte *lacZ*-Sonde eingesetzt (**E**). Die β -Galaktosidase Expression in den Embryonen konnte im Stadium 11 (**A**), 13 (**B-D**) und 14 (**F**) nur in einem Teil der FCM's oder fusionierten Muskeln detektiert werden. Die Anzahl der β -Galaktosidase positiven Zellen nimmt allerdings im Laufe der Embryogenese zu. Im Stadium 17 sind alle Muskeln β -Galaktosidase positiv (**G**). Die *lacZ* mRNA kann allerdings schon ab dem Stadium 11 in allen FCM's nachgewiesen werden (**E**).

II. Vergleich der Determination der Founderzellen und fusionskompetenten Myoblasten in der somatischen und viszeralen Muskulatur

Die Untersuchung der Fusionen in der viszeralen Muskulatur von *Drosophila melanogaster* zeigte viele Parallelen zum ähnlich verlaufenden Prozeß in der somatischen Muskulatur. In beiden Geweben gibt es zwei Zellgruppen, die miteinander fusionieren. Dies sind zum einen die Founderzellen, die durch die Expression von *dumbfounded* (*duf*) charakterisiert sind, und zum anderen die fusionskompetenten Myoblasten (FCM's), welche *sticks and stones* (*sns*) exprimieren. Des weiteren konnte in Mutanten, die einen Fusionsphänotyp in der somatischen Muskulatur zeigen, ein ebensolcher auch in der viszeralen Muskulatur beobachtet werden (San Martin et al., 2001; Klapper et al., 2002). Daher lag es nahe, bei der Suche nach Faktoren, welche die Determination der beiden Zelltypen in der viszeralen Muskulatur beeinflussen, zunächst die Faktoren zu untersuchen, die für die Determination in der somatischen Muskulatur verantwortlich sind.

5.4 *lethal of scute* ist nicht essentiell für die Ausbildung des viszeralen Mesoderms

In der somatischen Muskulatur beginnt die Determination der Founderzellen mit der Ausbildung von *lethal of scute* (*l'sc*) exprimierenden Zellgruppen. Von diesen Zellgruppen wird durch den Prozeß der lateralen Inhibition eine Zelle selektiert, in der die *l'sc* Expression fortgeführt wird, während sie in allen anderen Zellen erlischt. Diese Zelle wird zur Progenitorzelle, die durch eine weitere Teilung dann zwei Founderzellen oder eine Founderzelle sowie einen Vorläufer der adulten Muskulatur bildet (Carmena et al., 1995). Um herauszufinden, ob das Proneuralgen *l'sc* auch während der Ausbildung der viszeralen Muskulatur eine Rolle spielt, wurden zunächst Fliegenlinien untersucht, die eine Defizienz im Bereich des *achaete-scute* (*ac-sc*) Komplexes aufweisen (BL 835), zu welchem auch *l'sc* gehört. Die Embryonen wurden mit anti-FasciclinIII-Antikörpern (FasIII) (Patel et al., 1987) gefärbt, welche alle Zellen des viszeralen Mesoderms markieren. Durch die Lokalisation von

FasIII an der Membran der Zellen kann zudem leicht die Morphologie der Zellen beobachtet werden. Die beiden Zellpopulationen der zirkulären viszerale Muskulatur, die Founderzellen und fusionskompetenten Myoblasten (FCM's) mit ihrer unterschiedlichen Morphologie, können somit gut unterschieden werden. Die Founderzellen bilden im Stadium 11, vor dem Einsetzen der Fusionen, eine einzellige Zellreihe im ventralen Bereich des viszerale Mesoderms, deren Zellen durch eine eckige Form und eine starke FasIII-Expression gekennzeichnet sind. Die FCM's bilden im Gegensatz dazu eine mehrere Zellreihen dicke Schicht, die dorsal der Founderzellen lokalisiert ist. Diese Zellen sind wesentlich runder und zeigen außerdem eine schwächere FasIII-Expression (Abb. 5.9 E) (Klapper et al., 2002).

In *ac-sc* defizienten Embryonen konnten im Stadium 11 anhand der FasIII-Färbung beide Zellpopulationen ausgemacht werden. Allerdings weist das Band der Founderzellen in unregelmäßigen Abständen Lücken auf, während das Band der FCM's an diesen Stellen geschlossen ist (Pfeil in Abb. 5.9 A, Klammer in B). In Wildtyp-Embryonen können diese Lücken im Band des viszerale Mesoderms ebenfalls beobachtet werden, da sich dieses Band aus elf zunächst voneinander getrennten Zellgruppen bildet. Diese Lücken beziehen sich dann allerdings immer auf beide Zellgruppen und sind nicht nur in den Founderzellen vorhanden. Der beobachtete partielle Verlust der Founderzellen in den *ac-sc* defizienten Embryonen stimmt gut mit dem Phänotyp in der somatischen Muskulatur überein, in der auch nur einige Muskel-Vorläufer betroffen sind und diese jeweils nur in ca. 20% der Fälle einen Phänotyp zeigen (Carmenta et al., 1995). In späteren Stadien konnten keinerlei morphologische Abnormalitäten in der Ausbildung des viszerale Mesoderms festgestellt werden. Die in den defizienten Embryonen vorhandenen Founderzellen können also offensichtlich den lokalen Verlust von Founderzellen ausgleichen und eine funktionsfähige Mitteldarmmuskulatur ausbilden.

5.4.1 Generierung eines RNAi-Konstrukt zur posttranskriptionellen Genunterdrückung von *lethal of scute*

Da für das Gen *lethal of scute* keine Mutation vorhanden ist, sondern nur eine Defizienz untersucht werden konnte, die den gesamten *achaete-scute* Komplex entfernt, mußte nach anderen Strategien gesucht werden, um den beobachteten Phänotyp des partiellen Verlustes der Founderzellen in der viszerale Muskulatur diesem Gen zuordnen zu können. Dafür bot sich die Methode der RNA-Interferenz (RNAi) an. Diese Methode wurde in *Caenorhabditis*

elegans entwickelt. Die Injektion von doppelsträngiger RNA (dsRNA) in den Embryo von diesem Nematoden führt zur Unterdrückung desjenigen Proteins, welches durch die RNA kodiert wird, die zu der injizierten dsRNA komplementär ist (Fire et al., 1998).

Da jedoch die Injektion einen hohen experimentellen Aufwand bedeutet, wurden von mehreren Gruppen Konstrukte entwickelt, die die Expression selbstkomplementärer Transkripte, von sogenannten *inverted repeat* (IR) Konstrukten, zur Ausbildung intramolekularer doppelsträngiger RNA bewirkten (Lam und Thummel, 2000; Tavernakis et al., 2000). Neben diesen IR-Konstrukten, wurde auch die symmetrische Expression eines DNA-Fragmentes mit Hilfe zweier *UAS*-Promotorbereiche, die an beiden Seiten des Fragmentes lokalisiert sind, beschrieben (Giordano et al., 2002). In beiden Fällen wird durch endogene Prozessierung der Vorläufer dsRNA die entsprechende RNAi-Antwort ausgelöst. Dieser zweite Ansatz über die symmetrische Transkription, wurde auch für das RNAi-*l'sc*-Konstrukt gewählt.

Für das *lethal of scute* RNAi-Konstrukt (siehe Abb. 5.8) wurde ein *l'sc*-cDNA-Fragment mit einer Länge von 258 bp (Nukleotide 487-745) mit Hilfe von genspezifischen Oligonukleotiden (*lethal of scute* RNAi2 Sense und *lethal of scute antisense*) von Wildtyp-DNA durch PCR amplifiziert. Dabei wurde das Fragment so gewählt, daß es nicht die bHLH-Domäne des Proteins umschließt (Nukleotide 292 bis 484). Da diese Domänen oft eine hohe Homologie aufweisen, kann es sonst zu RNAi-Effekten in anderen bHLH-Genen kommen. Das PCR-Produkt wurde in pCRII-TOPO ligiert und aus diesem über die vektorspezifischen Restriktionsschnittstellen von *Eco* RI freigesetzt. Dieses Fragment wurde dann in den mit *Eco* RI behandelten Transformationsvektor pUAST ligiert, so daß der Vektor pUAST+*l'sc* resultierte. Die Orientierung des *l'sc*-cDNA-Fragments war dabei nicht von Bedeutung, da nachfolgend noch eine zweite, invertierte *UAS*-Promotorsequenz auf die andere Seite des cDNA-Fragmentes in den Vektor eingebracht wurde. Hierzu wurde der ca. 450 bp lange *UAS*-Promotorbereich aus dem Plasmid-Klon 339 (Dissertation Simone Lier, 2002) mit *Kpn* I herausgeschnitten und in den linearisierten pUAST+*l'sc* ligiert, so daß das Konstrukt pRNAi-*l'sc* resultierte. Der Plasmid-Klon 339 enthält den pCR-Blunt Vektor mit dem *UAS*-Promotorbereich, welcher mit Hilfe der Primer *pUAST-MCS-UAS* und *pUAST-UAS-blunt* aus dem pUAST-Vektor amplifiziert wurde (Dissertation Simone Lier, 2002).

Eine Sequenzierung der neu eingefügten *UAS*-Sequenz war nicht möglich, da sich wahrscheinlich die inversen *UAS*-Sequenzen aneinander anlagern und so die Sequenzierungsreaktion verhindern. Plasmide mit gewünschter Orientierung des *UAS*-Promotorbereichs wurden daher über Restriktionsanalyse identifiziert. Dabei entsteht bei der Behandlung mit *Not* I/*Xba* I ein 450 bp Fragment, während mit *Xba* I/*Spe* I kein Fragment

signifikanter Größe herausgeschnitten wird. Bei falscher Orientierung ist das Ergebnis genau umgekehrt (Abb. 5.8).

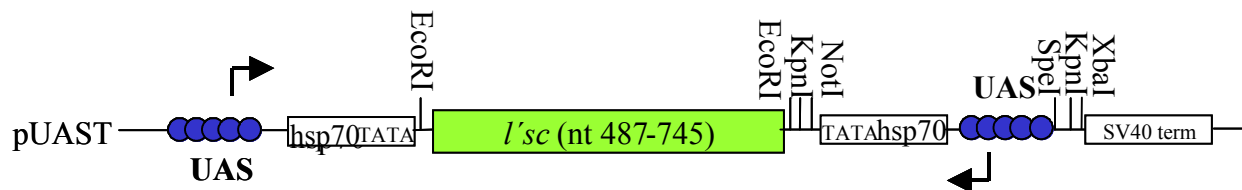


Abb. 5.8: Schematische Darstellung des *lethal of scute* RNAi Konstruktes (pRNAi-*l'sc*). Dieses Konstrukt beinhaltet ein *lethal of scute* Fragment, welches die Nukleotide 487 bis 745 umfaßt, in einem pUAST Vektor, dem ein zweiter UAS-Promotorbereich in inverser Orientierung eingefügt wurde. Relevante Restriktionsschnittstellen sind angegeben (weitere Erläuterungen s. Text).

Ein Konstrukt von pRNAi-*l'sc* mit der richtigen Orientierung wurde zur Transformation in *Drosophila* eingesetzt. Es wurden mehrere unabhängige Fliegenlinien etabliert, die eine Insertion des RNAi-*l'sc* Konstruktes auf dem 2. oder 3. Chromosom tragen. Zur Analyse der RNAi-Effekte wurden homozygote RNAi-*l'sc*-Fliegen mit *bagpipe*-*GAL4*-Fliegen (*bap-GAL4*) gekreuzt. Diese Linie aktiviert die Expression des Transgens ab dem Stadium 10 in den elf Zellgruppen im Rumpfmesoderm, die sich später zum Band der zirkulären viszeralen Muskulatur verbinden. Zur leichteren Identifizierung der Founderzellen tragen beide Fliegenlinien zusätzlich *rP298-lacZ*, eine Enhancer-Trap-Linie, welche die Expression von β -Galaktosidase in den Founderzellen aktiviert (Nose et al., 1998). Die Embryonen der F1 Generation wurden mit anti-FasIII- und anti- β -Galaktosidase-Antikörpern gefärbt. Es zeigte sich, wie schon bei den *ac-sc* defizienten Embryonen, ein teilweiser Verlust der Founderzellen im viszeralem Mesoderm, während das Band der FCM's an dieser Stelle geschlossen ist (Klammer in Abb. 5.9 C). Dies läßt darauf schließen, daß *lethal of scute* für die Determination von einem Teil der Founderzellen im viszeralem Mesoderm analog zum somatischen Mesoderm benötigt wird. Fehlende Founderzellen wurden allerdings auch in RNAi-*l'sc* Embryonen beobachtet, in denen die Transkription nicht durch die Kreuzung mit *bap-GAL4* aktiviert wurde. Die Lücken sind hier aber auf deutlich weniger Zellen begrenzt (Klammer in Abb. 5.9 D).

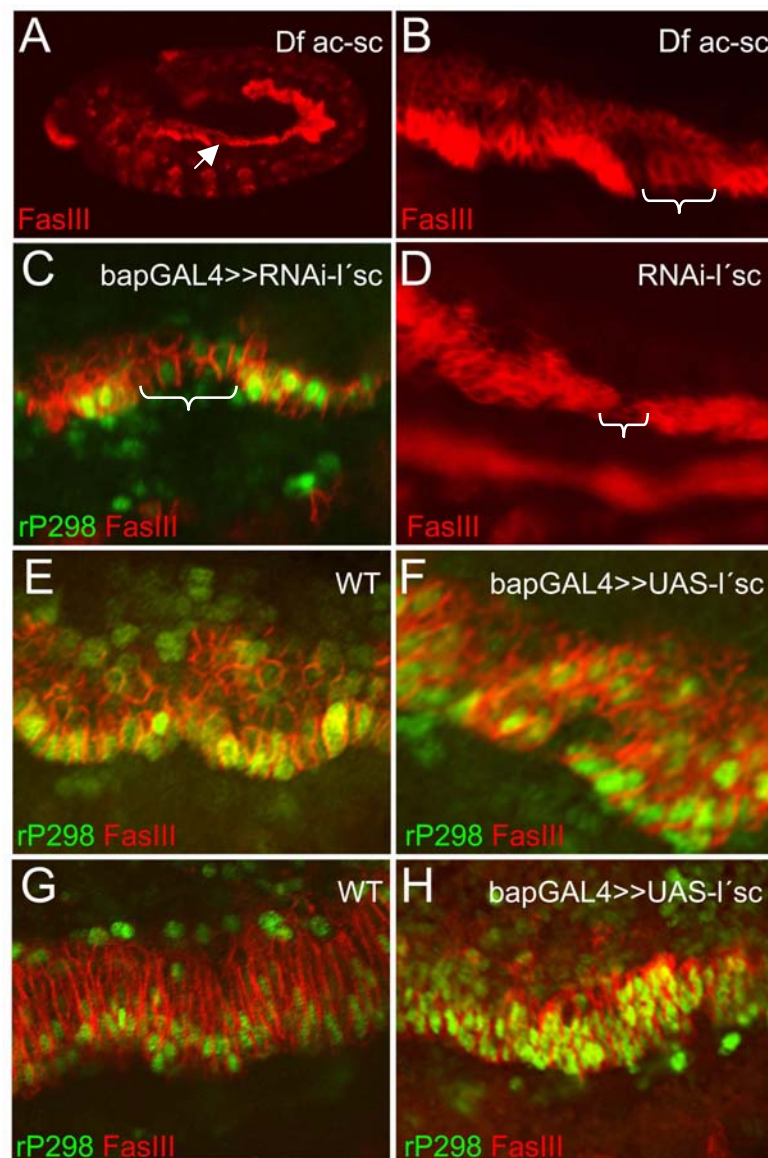


Abb. 5.9: Relevanz von *lethal of scute* bei der Determination der Founderzellen der viszerale Muskulatur. Das viszerale Mesoderm wird durch eine FasIII-Färbung dargestellt (rot in A–H). Die Founderzellen sind mit *rP298-lacZ* markiert (grün in C, E–H). A, B In Embryonen, die eine Defizienz im Bereich des *achaete-scute* Komplexes tragen, können im Stadium 11 Lücken im Band der Founderzellen beobachtet werden, während das Band der FCM's hier geschlossen ist (Klammer in B). C Der gleiche Effekt kann in Embryonen beobachtet werden, bei denen ein *l'sc*-RNAi Konstrukt im viszerale Mesoderm exprimiert wird. D Auch ohne die Kreuzung mit einer Treiberlinie sind diese Lücken zu beobachten, die dann hier aber kleiner sind als in den Embryonen, die mit einer Treiberlinie gekreuzt wurden (vergleiche C und D). E–H Durch die ektopische Expression von *l'sc* wird die Zahl der Founderzellen gegenüber dem Wildtyp (Stadium 11: E, Stadium 14: G) deutlich erhöht. Dieser Phänotyp kann sowohl im Stadium 11 (F) als auch im Stadium 14 (H) beobachtet werden.

5.4.2 Ektopische Expression von *UAS-lethal of scute* im viszeralem Mesoderm von *Drosophila* führt zur Erhöhung der Zahl der Founderzellen und zu einem Verlust von fusionskompetenten Myoblasten

Um weitere Hinweise zur Funktion von *lethal of scute* im viszeralem Mesoderm zu erhalten, wurde ein *UAS*-Konstrukt (*UAS-l'sc*) eingesetzt, welches die komplette cDNA des Gens enthält (Hinz et al., 1994). Als Aktivator-Linie wurde wiederum *bagpipe-GAL4* (*bap-GAL4*) (Zaffran et al., 2001) verwendet.

Die aus der Kreuzung von *bap-GAL4* Weibchen mit *UAS-l'sc* Männchen resultierenden Embryonen wurden einer Antikörperfärbung mit anti-FasIII und anti- β -Galaktosidase Antikörpern unterzogen. Es zeigte sich eine deutliche Erhöhung der Anzahl der Founderzellen gegenüber dem Wildtyp (Abb. 5.9 E, G) sowohl im Stadium 11 (Abb. 5.9 F) als auch im Stadium 14 (Abb. 5.9 H). Dies würde für eine Rolle von *l'sc* bei der Determination der Founderzellen im viszeralem Mesoderm sprechen. Außerdem war eine erhöhte Letalität der Nachkommen dieser Kreuzung zu beobachten (*bap-GAL4*>>*UAS-l'sc*: 74%; Kontrolle *UAS-l'sc*: 4%; Abb. 5.11).

5.4.3 Eine Expression von *Lethal of scute* im viszeralem Mesoderm konnte nicht nachgewiesen werden

Um auszuschließen, daß die beobachteten, durch die Expression des RNAi-Konstruktes bzw. der Überexpression von *l'sc* hervorgerufenen Phänotypen, auf nicht endogenen Effekten beruhen, sollte die Expression von *l'sc* im viszeralem Mesoderm nachgewiesen werden. Mit anti-*l'sc*-Antikörpern konnte bei keiner der gewählten Antikörper-Konzentration (1:10; 1:50; 1:100; 1:200; 1:400) eine Expression im viszeralem Mesoderm nachgewiesen werden. Um alternativ die *l'sc* mRNA nachzuweisen, wurden zum einen DIG-random markierte Sonden anhand eines pCRII-Topo Vektors, der die Nukleotide 487 bis 745 der *lethal of scute* cDNA umfaßte, generiert (pTopo-*l'sc*). Zum anderen wurden DIG-markierte RNA als auch DNA PCR-Sonden unter Verwendung der Primer *lethal of scute antisense* und *lethal of scute RNAi2 Sense* mit pTopo-*l'sc* als Templat generiert. Hierdurch wurden wiederum die Nukleotide 487 bis 745 amplifiziert. Mit keiner dieser Sonden, die alle im Spot-Test eine ausreichende Markierung zeigten, konnte die RNA von *l'sc* im viszeralem Mesoderm nachgewiesen werden. Ebenfalls gelang es jedoch weder mit den Antikörpern noch durch die

Sonden eine Expression in anderen Geweben, wie z.B. dem somatischen Mesoderm nachzuweisen, in denen die Expression schon beschrieben wurde. Die Analyse der *ac-sc* defizienten Embryonen, sowie die Ergebnisse des RNAi Experiments sprechen allerdings für eine Funktion von *lethal of scute* in der Determination der Founderzellen im viszeralem Mesoderm.

5.5 Notch beeinflusst die Founderzell-Determination im viszeralem Mesoderm

Wie unter 5.4 erwähnt, wird die Expression von *lethal of scute* im somatischen Mesoderm durch den Prozeß der lateralen Inhibition von ursprünglich einer Zellgruppe auf nur eine Zelle beschränkt, welche dann später zur Founderzelle wird. Dieser Prozeß wird durch das Transmembranprotein Notch und seinen Liganden Delta vermittelt (siehe auch 2.2). Der Notch-Signalweg spielt in vielen Entwicklungsprozessen eine wichtige Rolle. *Notch* (*N*) und *Delta* (*Dl*) Mutanten zeigen daher in vielen Geweben starke Defekte. Die Analyse von *N*^{55e11} und *Dl*^{B2} Embryonen (Abb. 5.10 B, C) mit FasIII-Antikörpern deutet auf eine Erhöhung der Zahl der Founderzellen gegenüber dem Wildtyp (Abb. 5.10 A) hin. *sns in situ* Hybridisierungen zeigten zudem in beiden Mutanten eine Verringerung der Zahl der FCM's an, welche durch dieses Gen charakterisiert sind (Abb. 5.10 E, F). In Wildtypembryonen ist *sns* im Stadium 11 in zwei Bändern exprimiert, die leiterartig miteinander verbunden sind. Das ventrale Band besteht aus den FCM's der somatischen Muskulatur, während das dorsale Band die viszerale FCM's repräsentiert (Abb. 5.10 D). In beiden Mutanten ist die *sns* Expression reduziert. Diese Reduktion ist stärker im ventralen, somatischen Band, aber auch die viszerale FCM's sind deutlich reduziert (Abb. 5.10 E, F).

Da *N*^{55e11} und *Dl*^{B2} Mutanten zudem sehr starke Defekte in anderen Geweben zeigen, kann nicht ausgeschlossen werden, daß die beobachteten Defekte im viszeralem Mesoderm auf sekundären Effekten aus den anderen Geweben beruhen, z.B. dem Verlust der FCM's in der somatischen Muskulatur. Daher wurden Überexpressionsversuche mit Hilfe des *UAS-GAL4*-Systems (Brand und Perrimon, 1993; siehe auch 4.15) durchgeführt. Zur Analyse der Überexpression von *Notch* und *Delta* wurden Fliegenlinien verwendet, die zusätzlich den Founderzellmarker *rP298-lacZ* tragen. Als Treiberlinie wurde *bap-GAL4* verwendet. Diese Linie aktiviert die Expression im zirkulären, viszeralem Mesoderm vom Stadium 10 an (Zaffran et al., 2001). Expression von *UAS-Notch*^{intra}, einem Konstrukt, welches nur die

intrazelluläre Domäne von Notch enthält und daher eine konstitutiv aktive Form von Notch darstellt (Lieber et al., 1993), oder von *UAS-N+Dl*, welches die kodierenden Regionen von beiden Genen enthält (M. Muskavitch, nicht publiziert), führte zum selben Phänotyp. In Mitteldarmpräparationen dieser Embryonen zeigte sich eine deutlich reduzierte Anzahl *rP298-lacZ* positiven Founderzellen im Vergleich mit der Wildtypsituation (Abb. 5.10 K, L). Dadurch fehlt die Mitteldarmmuskulatur in späteren Stadien. Die Founderzellen der longitudinalen viszerale Muskulatur, die einen anderen Ursprung am posterioren Ende des Keimstreifs haben und die durch die *bap-GAL4* Treiberlinie nicht beeinflusst wurden, wandern normal nach vorn (Pfeil in Abb. 5.10 L).

Als weiteren Hinweis für eine Beteiligung des Notch-Signalweges an der Determination der Founderzellen in der viszerale Muskulatur wurde eine dominant-negative Form von *Notch* (*UAS-dnN*; Rebay et al., 1993; Go et al., 1998) im viszerale Mesoderm mit *bap-GAL4* exprimiert. Die Embryonen zeigten, wie auch die *Notch* mutanten Embryonen, eine deutliche Erhöhung der Zahl der Founderzellen, obwohl immer noch einige wenige FCM's vorhanden sind (Abb. 5.10 M).

5.5.1 Notch ist im viszerale Mesoderm und Delta in den benachbarten Geweben exprimiert

Um auszuschließen, daß die beobachteten Überexpressions-Effekte auf nicht endogenen Effekten beruhen, die durch die Expression von Notch in den falschen Geweben hervorgerufen werden, wurde die Expression von Notch und Delta im Wildtyp untersucht. Notch konnte tatsächlich im viszerale Mesoderm an den Zellmembranen detektiert werden. Die Expression beginnt in den Stadien, in denen das viszerale Mesoderm determiniert wird. Im Stadium 11 konnte Notch in allen Zellen detektiert werden. Im Zuge der Fusion wird die Expression in den FCM's, welche eine stärkere *bap-lacZ* Expression zeigen (Abb. 5.10 G, H) schwächer.

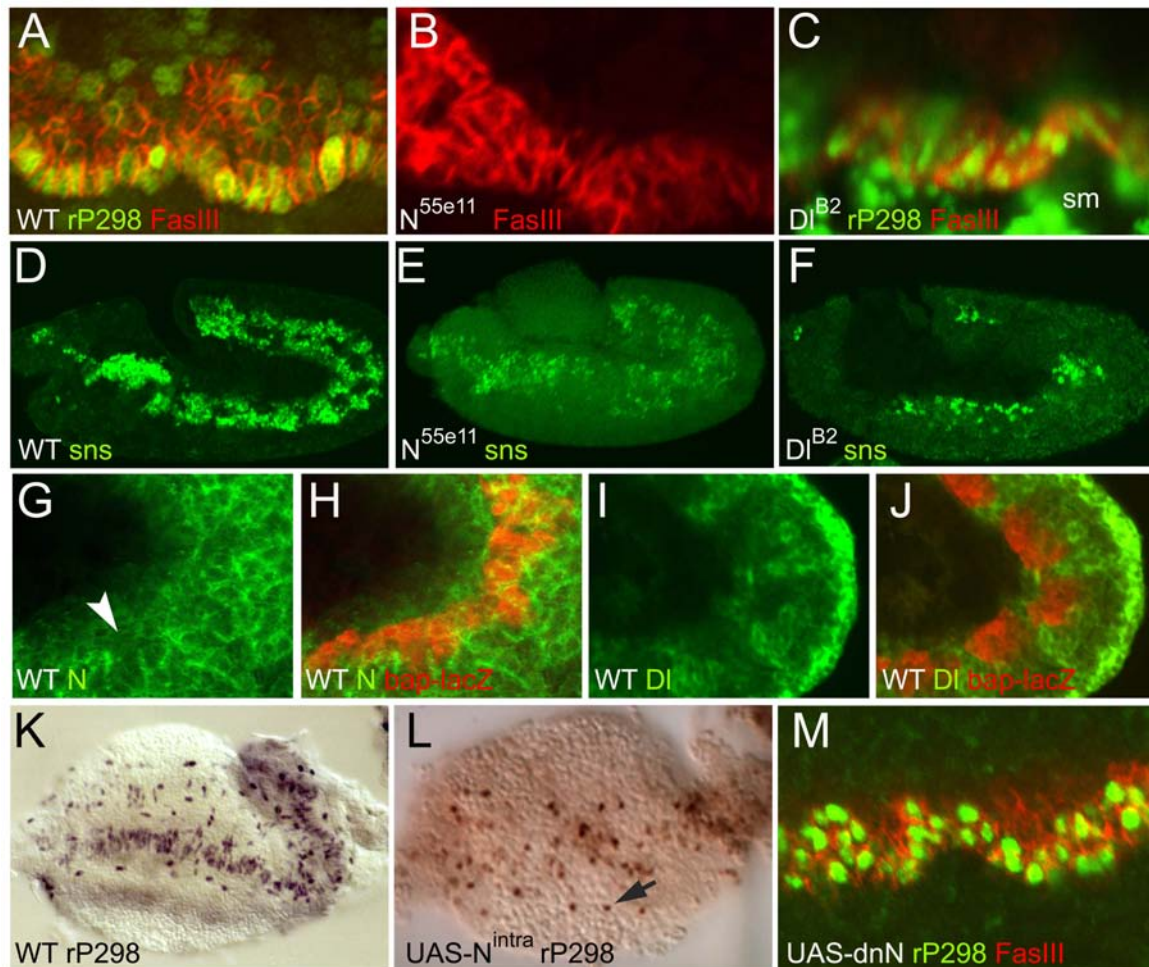


Abb. 5.10: Der Notch-Signalweg ist in der Determination der Founderzellen des viszerale Mesoderms involviert. Das viszerale Mesoderm wird durch FasIII-Antikörper (rot in **A**, **B**, **C** und **M**), β -Galaktosidase-Expression des Markers *bap-lacZ* (rot in **H**, **J**) oder des Founderzellmarkers *rP298-lacZ* (grün in **A**, **C**, **M**; braun in **K**, **L**) dargestellt. Die FCM's sind durch *sns in situ* Hybridisierungen gekennzeichnet (grün in **D-F**). Die Expression von Notch (grün in **G**, **H**) und Delta (grün in **I**, **J**) wurde mittels Antikörperfärbungen analysiert. **A** Das viszerale Mesoderm eines Wildtyp Embryos im Stadium 11. **B** In FasIII-Färbungen an N^{55e11} Embryonen scheinen die meisten Zellen des viszerale Mesoderms zu Founderzellen verwandelt worden sein, die sich durch ihre eckige Form und die stärkere FasIII-Expression auszeichnen. **C** In Dl^{B2} mutanten Embryonen des Stadium 11 ist dies ebenfalls der Fall. Die *rP298-lacZ* positiven Zellen ventral des viszerale Mesoderms gehören zum somatischen Mesoderm (sm). **D-F** Gezeigt sind *sns in situ* Hybridisierungen. Im Vergleich zum Wildtyp (**D**), in welchem *sns* im Stadium 11 in zwei Bändern exprimiert ist, ist diese Expression in N^{55e11} (**E**) und Dl^{B2} (**F**) Mutanten vor allem im ventralen Band des somatischen Mesoderms aber auch im dorsalen Band des viszerale Mesoderms reduziert. **G**, **H** Notch-Expression im viszerale Mesoderm eines Embryos im Stadium 11. **G** Notch ist gleichmäßig an der Zellmembran aller Zellen des viszerale Mesoderms exprimiert. **H** Diese Expression ist in den Zellen reduziert (Pfeilspitze in **G**), welche gleichzeitig *bap-lacZ* exprimieren. Bap ist in diesem Stadium hauptsächlich in den FCM's vorhanden. **I**, **J** Im Gegensatz zu Notch ist Delta nicht im viszerale Mesoderm exprimiert, sondern in den Zellen, die direkt neben den *bap-lacZ* positiven Zellen liegen. **K** *rP298-lacZ*-Expression im präparierten Mitteldarm eines Stadium 14 Wildtyp-Embryos. **L** Die Zahl der *rP298-lacZ* positiven Zellen des Mitteldarms ist in Embryonen, in denen *UAS-N^{intra}* mit einer *bap-GAL4* Treiberlinie überexprimiert wurde, stark reduziert. Die Founderzellen der longitudinalen viszerale Muskulatur sind nicht betroffen (Pfeil in **L**). **M** In Stadium 11 Embryonen, in denen eine dominant-negative Form von Notch (*dnN*) mit *bap-GAL4* überexprimiert wurde, ist die Zahl der *rP298-lacZ* positiven Zellen gegenüber dem Wildtyp (**A**) deutlich erhöht.

Delta hingegen, der Notch-Ligand, ist in diesen Stadien nicht im viszeralem Mesoderm exprimiert. Die Expression konnte allerdings in den angrenzenden Geweben beobachtet werden (Abb. 5.10 I, J). Das Signal für die Aktivierung des Notch-Signalweges könnte also im Falle des viszeralem Mesoderms nicht endogen, sondern aus den angrenzenden mesodermalen Geweben kommen. Um diese Hypothese zu testen wurde *UAS-Dl* im gesamten Mesoderm mit Hilfe eines *twist-GAL4* (*SG24-GAL4*) Treibers überexprimiert. Auch hier konnte kein Einfluß auf die Determination der Founderzellen im viszeralem Mesoderm beobachtet werden. Dies kann jedoch daran liegen, daß der Ligand schon im Wildtyp in ausreichender Menge vorhanden ist und der Rezeptor der limitierende Faktor ist. Eine andere Möglichkeit ist, daß Serrate, ein anderer Ligand für Notch, am Notch-Signalweg im viszeralem Mesoderm beteiligt ist (Rebay et al., 1991; De Cellis et al., 1993). Die Überexpression dieses Gens im viszeralem Mesoderm liefert allerdings ebenfalls keinen Phänotyp (Daten nicht gezeigt). Auch die Glykosyltransferase Fringe, welche die Fähigkeit von Notch, entweder an Delta oder bevorzugt an Serrate zu binden moduliert (Panin et al., 1997), bewirkt bei Überexpression im viszeralem Mesoderm keinerlei Phänotyp (Daten nicht gezeigt).

5.5.2 Embryonen in denen N^{intra} im viszeralem Mesoderm exprimiert wurde sterben als 1. Larve

Die Letalität der Embryonen in denen *UAS-N^{intra}* oder *UAS-N+Dl* überexprimiert wurde, zeigt den vom Phänotyp her zu erwartenden Effekt. Die meisten Embryonen entwickelten sich bis zum Ende der Embryonalentwicklung und schlüpften als 1. Larve (Abb 5.11: *bap-GAL4>>UAS-N+Dl* 78%; *bap-GAL4>>UAS-N^{intra}* 70%). Sie sterben jedoch direkt nach dem Schlüpfen, da sie aufgrund der fehlenden Mitteldarmmuskulatur nicht in der Lage sind, Nahrung aufzunehmen. Die übrigen Embryonen sterben während der Embryonalentwicklung. Die Überexpression von *UAS-Dl* im viszeralem Mesoderm zeigte keinen Phänotyp. Allerdings ist auch hier die Letalität der Embryonen während der Embryonalentwicklung deutlich gegenüber den Embryonen erhöht, die nur das *GAL4*- oder *UAS*-Konstrukt tragen, (Abb. 5.11 *bap-GAL4>>UAS-Dl* 65% embryonal letal; Kontrollen *bap-GAL4* 4%; *UAS-Dl* 23%).

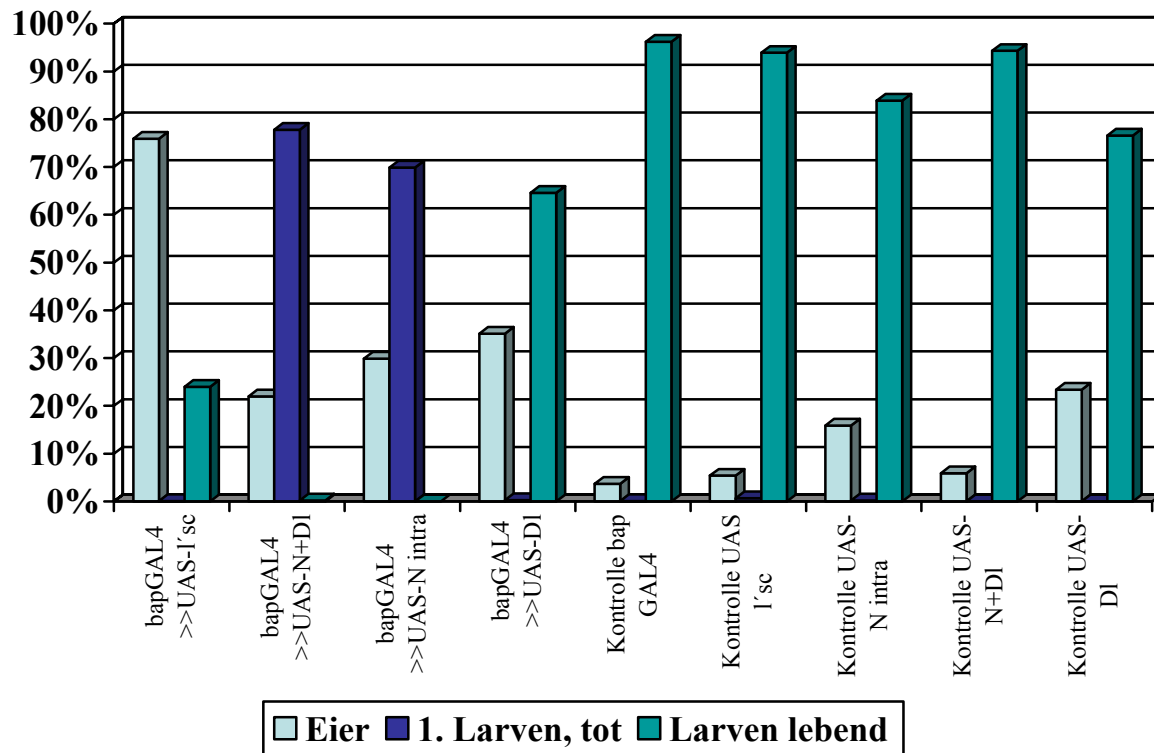


Abb. 5.11: Die ektopische Expression von *DI*, *N + DI*, *N^{intra}* und *l'sc* im viszeralem Mesoderm erhöht die Letalität der Nachkommen. Letalität und Überlebensraten von Nachkommen der Kreuzung verschiedener *UAS*-Linien mit *bap-GAL4* bzw. der jeweiligen *UAS*- und *GAL4*-Linien alleine. Alle Linien trugen zusätzlich den Founderzell-Marker *rP298-lacZ* ($n \approx 1000$).

5.6 Kuzbanian hat keinen Einfluß auf die Determination der Founderzellen im viszeralem Mesoderm

Nachdem gezeigt werden konnte, daß Notch an der Determination der Founderzellen im viszeralem Mesoderm beteiligt ist, sollten auch andere Faktoren dieses Signalweges untersucht werden. Kuzbanian (Kuz), eine Metalloprotease, ist an dem Prozeß beteiligt, der in der Freisetzung der intrazellulären Domäne von Notch resultiert. Dabei katalysiert Kuz die S2 Spaltung, die zunächst zur Freisetzung der extrazellulären Domäne von Notch führt (Lieber et al., 2002; siehe auch 2.2). Die Analyse von *kuz* mutanten Embryonen, die den Founderzellmarker *rP298-lacZ* tragen, mit anti-FasIII- und anti- β -Galaktosidase-Antikörpern zeigte, daß sie nicht den selben Phänotyp wie *Notch* Mutanten oder *dnN* Embryonen

aufweisen. Es entsteht zwar der Eindruck, daß die Zahl der Founderzellen in einigen Embryonen im Stadium 11 in einigen Bereichen leicht erhöht sein könnte (Abb. 5.12 A), aber neben den stark FasIII exprimierenden Founderzellen sind weiterhin die etwas schwächer FasIII exprimierenden FCM's vorhanden (Abb. 5.12 B). Auch in *sns in situ* Hybridisierungen an den mutanten Embryonen konnte keine Reduzierung der hierdurch gekennzeichneten FCM's im viszeralen Mesoderm beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Es gelang allerdings nicht auszuschließen, daß die nicht reduzierte *sns* Expression auf eine Ko-Expression von *sns* und *rP298-lacZ* in den selben Zellen zurückzuführen ist. Hierzu wurden *sns in situ* Hybridisierungen an *kuz* mutanten Embryonen durchgeführt, die gleichzeitig den Founderzellmarker *rP298-lacZ* tragen, und anschließend mit anti- β -Galaktosidase-Antikörpern angefärbt. Obwohl die Hybridisierungszeit, die einen negativen Einfluß auf die nachfolgende Antikörperfärbung zu haben scheint, bis auf nur 12 Stunden reduziert wurde, konnte die Antikörperfärbung kein Signal liefern, welches deutlich genug gewesen wäre, um diese Frage zu klären. Die weitere Entwicklung der Mitteldarmmuskulatur in *kuz* mutanten Embryonen verläuft normal. Der Mitteldarm wird gänzlich vom viszeralen Mesoderm umschlossen (Abb. 5.12 C) und die Darmkonstriktionen bilden sich normal aus (Daten nicht gezeigt).

Der extrem schwache Phänotyp der *kuz* mutanten Embryonen im viszeralen Mesoderm könnte auch auf eine starke maternale Komponente zurückzuführen sein. Um diese zu reduzieren und zudem zu klären, ob der Eindruck der erhöhten Zahl der Founderzellen verifizierbar ist, wurde mit Hilfe des *UAS-GAL4*-Systems *UAS-dnkuz*, eine dominant-negative Form von *kuz*, im viszeralen Mesoderm überexprimiert. In den Embryonen, in denen *UAS-dnkuz* mit einem *bap-GAL4* Treiber überexprimiert wurde, konnte im Stadium 11 immer nur eine Zellreihe mit *rP298-lacZ* positiven Founderzellen beobachtet werden (Abb. 5.12 D, E). Die weitere Entwicklung verläuft auch hier wie im Wildtyp und die drei Darmkonstriktionen bilden sich normal aus (Abb. 5.12 F).

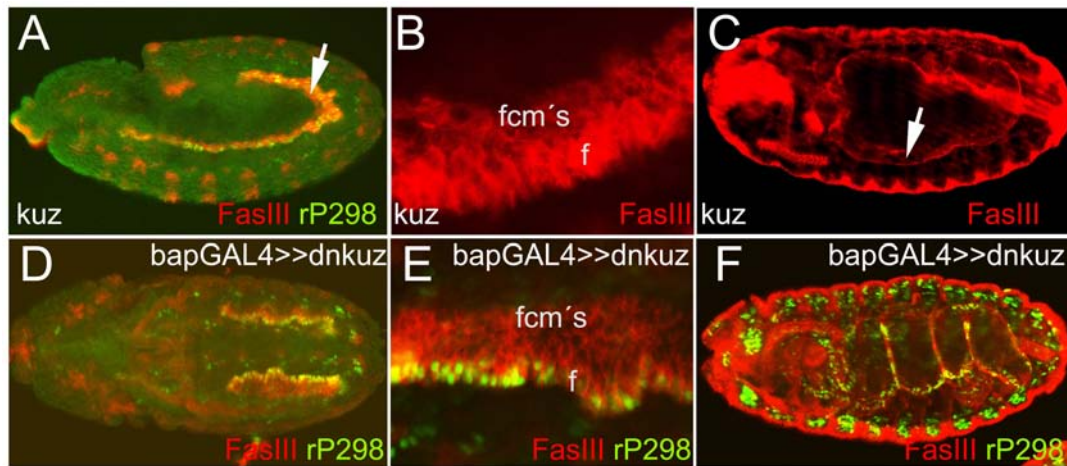


Abb. 5.12: *kuzbanian* mutante Embryonen zeigen keinen Phänotyp in der viszeralen Muskulatur. Gezeigt sind *kuz* mutante Embryonen (A, B *kuz*^{v9} Hummel et al., 1999a, b; C *kuz*³ BL 3653) bzw. Embryonen in denen eine dominant negative Form von *kuz* im viszeralen Mesoderm durch die *bap-GAL4*-Treiberlinie ektopisch exprimiert wurde (D-F). Das viszerale Mesoderm wurde durch anti-FasIII-Antikörper visualisiert (rot in A-F; Pfeile in A, C) während die Founderzellen mit *rP298-lacZ* markiert sind (grün in A, D-F). A-C In den *kuz* mutanten Embryonen scheint die Zahl der Founderzellen im Stadium 11 teilweise erhöht zu sein (A) aber es sind immer noch FCM's vorhanden (B). Die weitere Entwicklung des viszeralen Mesoderms verläuft wildtypisch (C). D-F In Embryonen in denen *dnkuz* im viszeralen Mesoderm exprimiert wurde, ist weder im Stadium 11 (D, E) noch in späteren Stadien ein Unterschied zur Entwicklung des viszeralen Mesoderms zum Wildtyp zu erkennen.

5.7 Suppressor of Hairless ist nicht essentiell für die Vermittlung des Notch-Signalweges in der viszeralen Muskulatur

Die Aktivierung des Notch-Signalweges führt in den meisten Geweben zur Aktivierung von *Suppressor of Hairless* [*Su(H)*] über die freigesetzte intrazelluläre Domäne von Notch (N^{intra}). In der Abwesenheit von N^{intra} reprimiert *Su(H)* zusammen mit Co-Repressoren die Funktion von Aktivatoren. N^{intra} verdrängt die Co-Repressoren und wirkt zusammen mit *Su(H)* als Transaktivator, der die Transkription verschiedener Effektorgene fördert. Die Anwesenheit von N^{intra} macht also aus dem Repressor *Su(H)* einen transkriptionellen Aktivator (Übersichtsartikel: Bray und Furriols, 2001). Allerdings können N^{intra} und *Su(H)* alleine nicht die Transkription der Zielgene bewirken, sie benötigen Enhancer-spezifische Faktoren. Diese Eigenschaften von *Su(H)* wurden von Furriols und Bray, 2001 genutzt, um ein Reporter-Konstrukt für die Aktivität des Notch-Signalweges zu etablieren. Hierbei wurde der ubiquitär exprimierte Transkriptionsfaktor Grainyhead (*Grh*) verwendet, welcher palindromische

Bindestellen (Grainyhead binding elements, Gbe) erkennt. Diese bewirken, wenn sie in drei Kopien mit einem Minimalpromotor kombiniert werden, die Expression von *lacZ*. Die Grh-Bindestellen wurden mit Su(H) Bindestellen kombiniert und wiederum *lacZ* als Reportergen verwendet. In Zellen, in denen der Notch-Signalweg aktiv ist, verwandelt N^{intra} den Repressor Su(H) in einen Aktivator. Zusammen mit Grh kann dann die Transkription von *lacZ* aktiviert werden. In Zellen, in denen kein N^{intra} vorhanden ist, wirkt Su(H) weiterhin als Repressor und es ist keine Reportergenaktivität zu beobachten (Furriols und Bray, 2001). Dieses Konstrukt wurde verwendet, um zu überprüfen, in welchen Zellen der Notch-Signalweg im viszerale Mesoderm aktiv ist.

Dazu wurden Doppelfärbungen gegen β -Galaktosidase und FasIII als Marker für das viszerale Mesoderm durchgeführt. FasIII wird ab dem frühen Stadium 11 in den Zellen des viszerale Mesoderms exprimiert. Zu dieser Zeit findet die Unterteilung der Zellen in Founderzellen und FCM's statt. Weder zu diesem frühen Zeitpunkt (Abb. 5.13 A, B) noch in späteren Stadien war eine gleichzeitige Expression von FasIII und β -Galaktosidase zu erkennen (Abb. 5.13 C-G). Da β -Galaktosidase ein sehr stabiles Protein ist und in der Regel sehr lange in der Zelle detektiert werden kann, deutet dies darauf hin, daß das Reporterkonstrukt in den Zellen des viszerale Mesoderms nicht aktiviert wird. Um auszuschließen, daß die Expression sehr früh und nur transient ist, wurde mit Tinman (Tin) ein noch früherer Marker für das viszerale Mesoderm verwendet. Tin wird in den Zellen des viszerale Mesoderms und des Herzens ab dem frühen Stadium 10 exprimiert und markiert das viszerale Mesoderm daher ab dem Zeitpunkt, an dem es von den anderen mesodermalen Geweben abgetrennt wird (Bodmer et al., 1993; Azpiazu und Frasch 1993). Auch mit diesem Marker konnte in den Doppelfärbungen keine gleichzeitige Expression von β -Galaktosidase und Tin im viszerale Mesoderm beobachtet werden (Abb. 5.13 H, I).

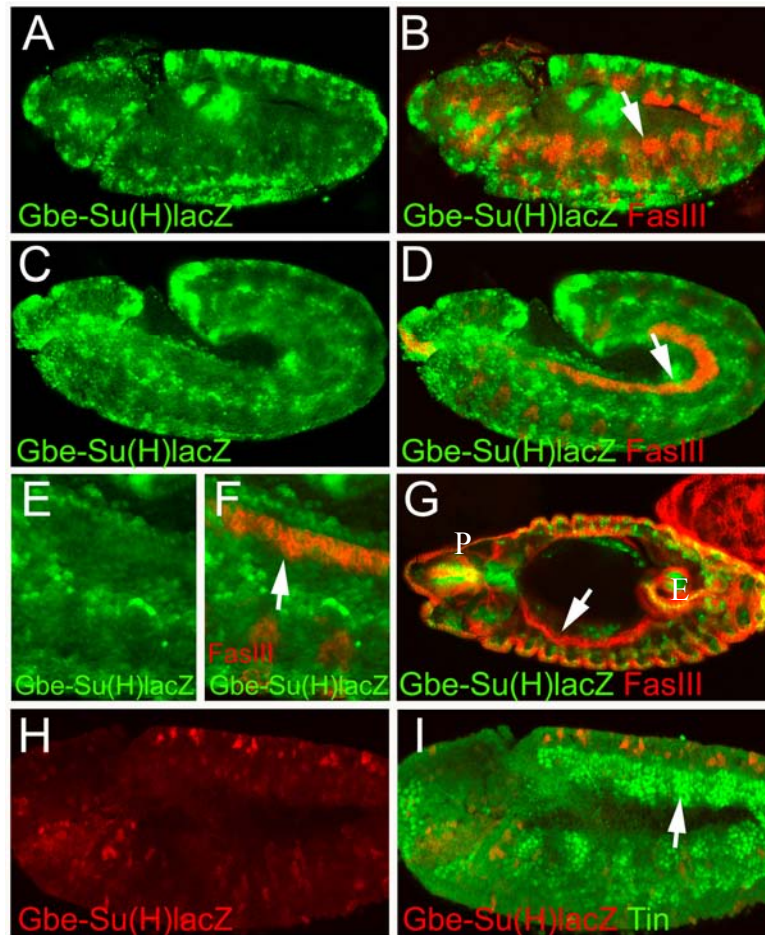


Abb. 5.13: *Gbe-Su(H)lacZ* ist nicht im viszeralem Mesoderm exprimiert. Dargestellt ist die Expression von *Gbe-Su(H)-lacZ* (grün in A-G; rot in H, I) in Embryonen des Stadiums 11 (A, B), 12 (C-F), 15 (G) oder 10 (H, I). Das viszerale Mesoderm (Pfeile in B, D, F, G, I) wurde mit *FasIII* (B, D, F, G) oder *Tin* (I) markiert. In keinem Stadium konnte eine Expression von *lacZ* im viszeralem Mesoderm des Mitteldarms detektiert werden. P: Pharynx, E: Enddarm.

Um diese Ergebnisse zu überprüfen wurden *FasIII*-Färbungen an *Su(H)* mutanten Embryonen durchgeführt. Es konnte allerdings nicht geklärt werden, ob die Zahl der Founderzellen verändert war, da durch das Fehlen eines Blaubalancers die Identifizierung der mutanten Embryonen erschwert war. Eine Umbalancierung schlug fehl, da die auf dem Gegenchromosom vorhandenen Inversionen für die Vitalität der Linie essentiell zu sein scheinen (siehe Material).

Obwohl Notch in die Determination der Founderzellen in der viszeralem Muskulatur involviert ist (siehe Abschnitt 5.5), scheinen andere Faktoren des Signalweges, die in anderen Geweben, wie z.B. dem Nervensystem oder der somatischen Muskulatur, eine wichtige Rolle bei der Signaltransduktion spielen, an diesem Prozeß in der viszeralem Muskulatur nicht beteiligt zu sein.

III. Screen zur Identifizierung neuer an der Ausbildung des viszeralen Mesoderms beteiligter Faktoren

5.8 Durch den Screen einer Kollektion EMS-mutagenisierter Fliegen werden acht Fliegenlinien erhalten

Um mehr über die Mechanismen zu erfahren, die für die Ausbildung des viszeralen Mesoderms verantwortlich sind, wurde eine Kollektion von EMS-mutagenisierten Fliegen durchgemustert (Hummel et al., 1999a, b). Hierbei sollten Gene identifiziert werden, die entweder an der Determination der Founderzellen und fusionskompetenten Myoblasten (FCM's) beteiligt, oder für andere Aspekte der Entwicklung des viszeralen Mesoderms verantwortlich sind. Eine weitere Anforderung war, daß diese Gene nicht an der Entwicklung des somatischen Mesoderms beteiligt sind. Für die Analyse wurden Eiablagen von 194 Fliegenlinien mit embryonal letalen Mutationen auf dem 2. Chromosom und 304 Fliegenlinien mit embryonal letalen Mutationen auf dem 3. Chromosom gesammelt. Diese wurden fixiert, mit anti-FasIII-Antikörpern gefärbt und am Fluoreszenzmikroskop analysiert. FasIII ist im gesamten viszeralen Mesoderm exprimiert und erlaubt durch seine Lokalisation an der Zellmembran eine Unterscheidung zwischen den mehr eckigen Founderzellen und den runderen FCM's. Außerdem ist die FasIII-Färbung in den Founderzellen deutlich stärker.

Es konnten acht Fliegenlinien mit spezifischen viszeralen Phänotypen identifiziert werden, die sich anhand ihrer Ausprägung in drei Gruppen einteilen lassen. Die Embryonen der ersten Gruppe zeichnen sich durch den spezifischen Verlust der Founderzellen im viszeralen Mesoderm aus. Nach dem Stadium 12 ist in den Embryonen dieser Gruppe kein viszerales Mesoderm mehr vorhanden. Die zweite Gruppe bildet ein viszerales Mesoderm aus, welches bis zum Ende der Embryonalentwicklung vorhanden ist, aber die viszeralen Zellen wandern nicht nach dorsal oder ventral und umschließen somit nicht den Mitteldarm. Bei Embryonen der dritten Gruppe ist kein viszerales Mesoderm in der FasIII-Färbung zu erkennen. Embryonen, die einer vierten Gruppe angehören und durch mehr oder weniger große Lücken im Band des viszeralen Mesoderms charakterisiert sind, wurden nicht weiter analysiert, da dieser Phänotyp oft durch sekundäre Effekte in anderen Geweben hervorgerufen werden kann. Die Analyse der Mutanten der Gruppen eins bis drei wird im Folgenden beschrieben.

III.a Analyse der Mutanten der 1. Gruppe

Da die Embryonen der 1. Gruppe aufgrund ihres Phänotyps besonders interessant in Bezug auf die Problemstellung dieser Arbeit sind, wurden sie als erstes einer Analyse unterzogen.

5.9 *wellville* (*weli*) und *milliways* (*mili*) sind durch den spezifischen Verlust der Founderzellen in der viszeralen Muskulatur charakterisiert

Es wurden zwei Mutanten der 1. Gruppe identifiziert, die beide eine Mutation auf dem 2. Chromosom tragen, welche den gleichen Phänotyp hervorruft. In beiden wird das Band des viszeralen Mesoderms im Stadium 11 ausgebildet, aber in der Antikörperfärbung gegen FasIII ist sichtbar, daß das Band nur aus den globulären FCM's besteht, während die stärker FasIII exprimierenden, eckigen Founderzellen fehlen (Abb. 5.14 A, B, C). FasIII- und β -Galaktosidase-Antikörperfärbungen an Fliegenlinien, die zusätzlich den Founderzellmarker *rP298-lacZ* tragen, welcher das Expressionsmuster von *duf/kirre* reflektiert, zeigen, daß in der Tat keine Founderzellen im viszeralen Mesoderm vorhanden sind (Abb. 5.14 D, E, F). Dies führt dazu, daß in späteren Stadien in beiden Mutanten kein viszerales Mesoderm vorhanden ist (Abb. 5.14 G, H, I). Bei der Determination der Founderzellen in der somatischen Muskulatur ist kein Unterschied zum Wildtyp zu erkennen (Abb. 5.14 J-L). Im Gegensatz zum oben beschriebenen Notch-Signalweg, der sowohl für die Determination der Founderzellen und FCM's in der somatischen als auch in der viszeralen Muskulatur benötigt wird, scheinen die in diesen beiden Mutanten betroffenen Gene an einem Prozeß beteiligt zu sein, der spezifisch für die Determination der Founderzellen in der viszeralen Muskulatur benötigt wird.

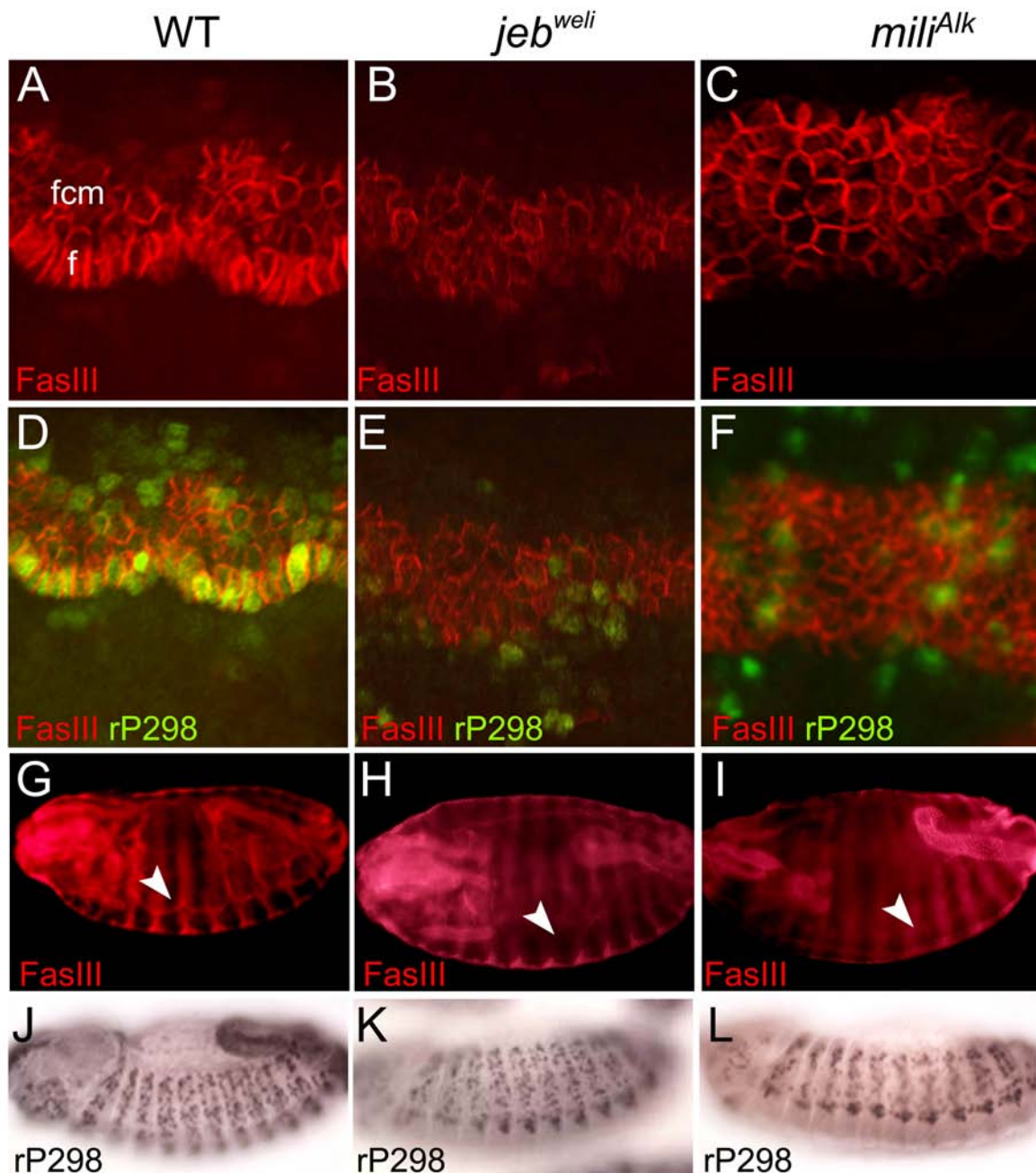


Abb. 5.14: In *jeb^{weli}* und *mili^{Alk}* Mutanten werden die Founderzellen des viszerale Mesoderms nicht gebildet. Die Entwicklung des viszerale Mesoderms ist durch FasIII-Antikörperfärbungen dargestellt (rot in A-I). Die Kerne der Founderzellen sind mit *rP298-lacZ* markiert (grün in D-F; braun in J-L). Wildtyp-Embryonen sind in A, D, G, und J, *jeb^{weli}* mutante Embryonen in B, E, H und K, *mili^{Alk}* mutante Embryonen in C, F, I und L dargestellt. Die im Wildtyp (A, D) erkennbaren, viszerale Founderzellen fehlen in *jeb^{weli}* (B, E) und *mili^{Alk}* (C, F) Mutanten des Stadiums 11. Die *rP298-lacZ* positiven Zellen, die in den Mutanten beobachtet werden können, gehören zur somatischen Muskulatur. G-I In späteren Stadien (Stadium 16) ist in den Mutanten kein viszerale Mesoderm detektierbar (Pfeilspitzen in G-I). J-L Die Founderzellen des somatische Mesoderms sind nicht betroffen (Stadium 14).

5.10 Identifizierung von *jelly belly* (*jeb^{weli}*) und seinem Rezeptor *milliways* (*mili^{Alk}*)

Um Informationen über die durch die Mutationen betroffenen Gene zu erhalten, wurden die beiden Mutanten zunächst kreuzungsgenetischen Analysen unterzogen. Die Kreuzung der beiden Mutanten untereinander zeigte, daß sie nicht zueinander allelisch sind. Des weiteren wurden Komplementationstests mit Mutanten auf dem 2. Chromosom durchgeführt, die dafür bekannt sind, daß sie die Entwicklung des viszeralen Mesoderms beeinflussen [*schnurri* (BL 3008), *mothers against dpp* (BL 10474), *thick veins* (BL 3242) und *jelly belly* (*jeb*) (BL 10576)]. Es zeigte sich, daß *weli* ein neues *jelly belly* (*jeb^{weli}*) Allel ist. *jeb* kodiert für ein sekretiertes Protein, welches im somatischen Mesoderm produziert wird, aber für die Entwicklung des viszeralen Mesoderms benötigt wird. Hier sollte es für die richtige Migration und Differenzierung des viszeralen Mesoderms verantwortlich sein (Weiss et al., 2001). Der spezifische Verlust der Founderzellen in diesem Gewebe war nicht beschrieben.

Da *mili* denselben Phänotyp wie *jeb^{weli}* zeigt, lag die Vermutung nahe, daß beide Gene im selben Signalweg eine Rolle spielen. *Jeb* ist ein sekretiertes Protein, daher war der vielversprechendste Kandidat für *mili* *Drosophila Alk*. *Alk* kodiert für eine Rezeptor-Tyrosin-Kinase (RTK), die sowohl im zentralen Nervensystem, als auch im viszeralen Mesoderm von *Drosophila* exprimiert ist (Lorén et al., 2001). *Alk* wurde als Homolog des humanen *Anaplastic lymphoma kinase* (*Alk*), welche zur Insulin Rezeptor Familie gehört, identifiziert und erstmals bei der Krankheit Non-Hodgkin's Lymphoma als Proto-Onkogen beschrieben. Seine normale Funktion ist bislang nicht bekannt (Morris et al., 1994; Duyster et al., 2001). In Mäusen wurde eine Expression von *Alk* bislang ausschließlich im sich entwickelnden Nervensystem beschrieben (Iwahara et al 1997; Übersichtsartikel: Pulfort et al., 2004). Um die Vermutung zu testen, daß *mili* ein neues *Alk* Allel ist, wurde es gegen eine neu etablierte Defizienz (*Df(2R)AlkΔ21*) getestet, in der *Drosophila Alk* nicht mehr vorhanden ist (Lorén et al., 2003). Tatsächlich ist *mili* zu dieser Defizienz allelisch. Zudem zeigen die transheterozygoten Embryonen in FasIII-Antikörperfärbungen denselben Phänotyp, wie die Mutanten. Zur weiteren Bestätigung wurde *mili* auch gegen ein neu generiertes *Alk^l* Allel getestet (Lorén et al., 2003). Da auch *mili* und *Alk^l* zueinander allelisch sind, stellt *mili* in der Tat ein neues *Alk* Allel dar und wurde daher *mili^{Alk}* genannt.

5.10.1 Der Phänotyp von *jeb^{weli}* und *mili^{Alk}* kann durch Expression der *jeb* bzw. *Alk* cDNA sowie einer aktivierten Form von *Alk* gerettet werden

Um weiter zu belegen, daß es sich bei *jeb^{weli}* und *mili^{Alk}* tatsächlich um neue *Alk* und *jeb* Allele handelte, sollte der Phänotyp durch die Expression der cDNA's der entsprechenden Gene gerettet werden (*UAS-jeb*: Weiss et al., 2001; *UAS-Alk*: Lóren et al., 2001). Hierzu wurden Fliegenlinien mit den folgenden Genotypen generiert und miteinander gekreuzt:

$$\begin{array}{c} \boxed{\frac{mili^{Alk}}{CyO_{hg-lacZ}} ; \frac{UAS-Alk}{UAS-Alk}} \times \boxed{\frac{mili^{Alk}}{CyO_{hg-lacZ}} ; \frac{bap-GAL4}{bap-GAL4}} \\[2ex] \boxed{\frac{jeb^{weli}}{CyO_{hg-lacZ}} ; \frac{UAS-jeb}{UAS-jeb}} \times \boxed{\frac{jeb^{weli}}{CyO_{hg-lacZ}} ; \frac{bap-GAL4}{bap-GAL4}} \end{array}$$

Ein Viertel der Nachkommen der Kreuzung ist homozygot für die jeweilige Mutation. Diese können durch das Fehlen der Balancerfärbung erkannt werden. Durch die gleichzeitige Anwesenheit der *UAS*- und *GAL4*-Konstrukte in diesen Fliegen, wird die Expression der cDNA des jeweiligen Gens im viszeralem Mesoderm bewirkt. Die Embryonen wurden mit FasIII-Antikörpern gefärbt. Es zeigte sich, daß durch die Expression der jeweiligen cDNA der Verlust der Founder in der viszeralem Muskulatur aufgehoben wird (Abb. 5.15 A, B). In den *mili^{Alk}* mutanten Embryonen, in denen die *Alk* cDNA im viszeralem Mesoderm exprimiert wurde, waren allerdings morphologische Störungen zu erkennen. Die Zellen des viszeralem Mesoderms streckten sich zwar nach dorsal und ventral, aber sie sind nicht richtig ausgerichtet (Abb. 5.15 B). Trotzdem waren in späteren Stadien keine Defekte im viszeralem Mesoderm zu erkennen (Daten nicht gezeigt). Diese Ergebnisse zeigen, daß die beiden neuen Mutanten tatsächlich neue Allele von *Alk* und *jeb* sind.

Derselbe Effekt konnte beobachtet werden, wenn eine aktivierte Form von *Alk* (*RTPT-Alk*, Lorén et al., 2003) sowohl in *mili^{Alk}* als auch in *jeb^{weli}* mutantem genetischen Hintergrund überexprimiert wurde. In beiden Mutanten konnten nach der Überexpression im Stadium 11 sowohl Founder als auch FCM's in der FasIII-Antikörperfärbung beobachtet werden. Allerdings ist die Zahl der stärker FasIII-exprimierenden Founderzellen gegenüber dem Wildtyp erhöht (Abb. 5.15 C-F). In späteren Stadien ist ein normal entwickeltes viszerales Mesoderm zu erkennen (Abb. 5.15 G, H). Die Überexpression der aktivierten Form von *Alk* in

den mutanten Embryonen und die daraus resultierende Rettung des Phänotyps in beiden Mutanten deutet darauf hin, daß sie in den selben Signalweg involviert sind.

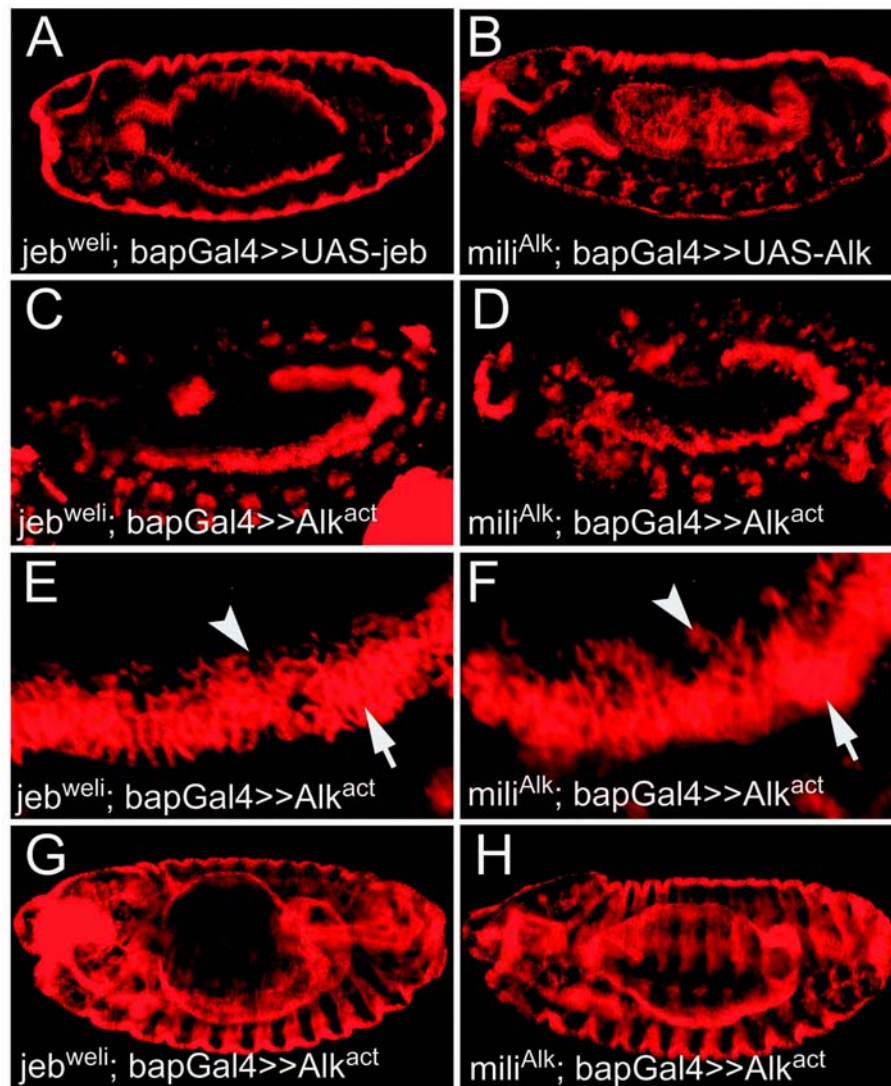


Abb. 5.15 Der Phänotyp von *jeb^{weli}* und *mili^{Alk}* mutanten Embryonen kann durch ektopische Expression der *jeb* bzw. *Alk* cDNA sowie einer aktivierten Form von *Alk* gerettet werden. Gezeigt sind *jeb^{weli}* (A, C, E und G) und *mili^{Alk}* (B, D, F und H) mutante Embryonen in denen *UAS-jeb* (A), *UAS-Alk* (B) oder eine aktivierte Form von *Alk*, *UAS-RTPT-Alk* mit Hilfe der *bap-GAL4*-Treiberlinie überexprimiert wurde. Alle Embryonen wurden mit FasIII-Antikörpern gefärbt. **A** Durch die Expression der *jeb* cDNA kann der Phänotyp von *jeb^{weli}* gerettet werden und die Embryonen weisen im Stadium 14 ein intaktes viszerale Mesoderm auf. **B** Auch der Phänotyp der *mili^{Alk}* Mutante kann durch Expression der *Alk* cDNA gerettet werden. Das viszerale Mesoderm weist allerdings morphologische Unregelmäßigkeiten auf, die sich in den nicht richtig ausgerichteten viszerale Muskelfasern äußern. **C-H** Durch die Überexpression einer aktivierten Form von *Alk* kann sowohl der Phänotyp von *jeb^{weli}* als auch von *mili^{Alk}* gerettet werden. Im Stadium 11 (**C-F**) können Founderzellen (Pfeil in E, F) und FCM's (Pfeilspitze in E, F) detektiert werden. Im Stadium 14 (**G, H**) sind keine Unterschiede zum Wildtyp zu erkennen.

5.11 Alk ist in *mili*^{Alk} Mutanten fehllokalisiert

Um das neu identifizierte *Alk* Allel, *mili*^{Alk}, genauer zu charakterisieren und die Expression des Proteins zu untersuchen, wurden Antigen-Nachweise mit anti-*Alk*-Antikörpern durchgeführt (Lorén et al., 2003). In Wildtyp-Embryonen des Stadiums 11 konnte das *Alk*-Protein an den Zellmembranen des viszerale Mesoderms detektiert werden (Abb. 5.16 A-C). Diese Lokalisierung ist nicht von der Anwesenheit des Liganden abhängig, da auch in *jeb*^{weli} Mutanten das Protein weiterhin nur an den Zellmembranen der FCM's vorhanden ist (Abb. 5.16 D-F).

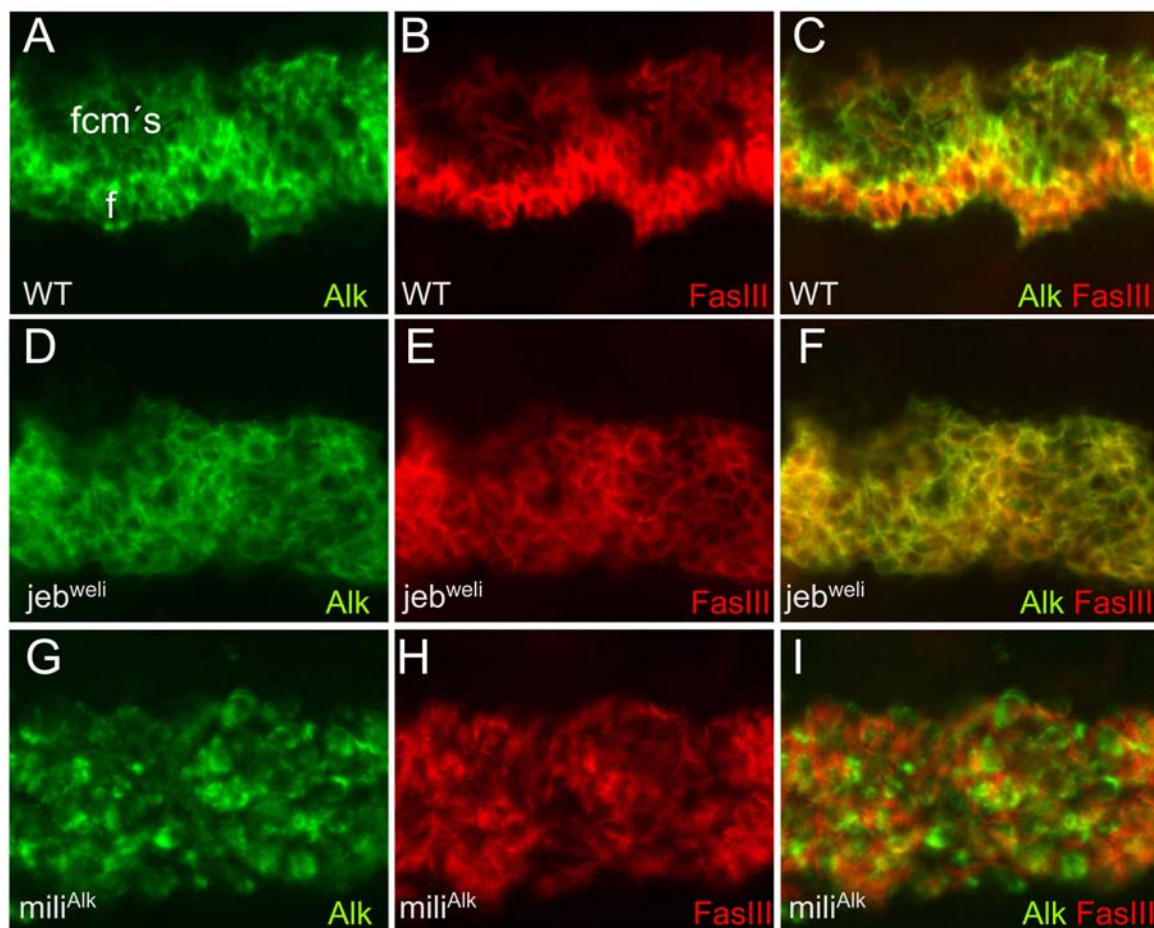


Abb. 5.16: Das *Alk*-Protein wird an der Zellmembran aller Zellen des viszerale Mesoderms exprimiert und ist in *mili*^{Alk} mutanten Embryonen im Zytoplasma fehllokalisiert. Stadium 11 Embryonen wurden mit anti-FasIII-Antikörpern (rot in B, C, E, F, H, I) zur Markierung aller Zellen des viszerale Mesoderms oder mit anti-*Alk*-Antikörpern (grün in A, C, D, F, G, I) gefärbt. A-C in Wildtyp-Embryonen ist *Alk* an der Membran der Founderzellen und FCM's exprimiert. D-F Die Lokalisation von *Alk* ist in *jeb*^{weli} Mutanten nicht verändert. G-I Auch in *mili*^{Alk} Mutanten ist das Protein noch detektierbar, allerdings ist es nicht mehr an der Zellmembran lokalisiert, sondern befindet sich im Zytoplasma der Zellen.

Auch in *mili*^{Alk} mutanten Embryonen des Stadiums 11 konnte das Protein weiterhin detektiert werden. Allerdings ist es nicht an den Membranen lokalisiert, sondern befindet sich im Zytoplasma der Zelle (Abb. 5.16 G-I). Durch diese Fehllokalisation kann die RTK Alk ihre Funktion nicht erfüllen. *mili*^{Alk} kann also als phänotypisches Null-Allel angesehen werden, obwohl in der Mutante noch detektierbares Protein vorhanden ist.

5.12 Jeb ist im viszeralen Mesoderm der Ligand für die Rezeptor Tyrosin Kinase Mili^{Alk}

5.12.1 Alk und Jeb ko-lokalisieren an der Membran der viszeralen Founderzellen

Das Alk-Protein ist in Wildtyp-Embryonen sowohl in den Founderzellen vorhanden, für deren Differenzierung die Aktivität von Alk erforderlich ist, als auch in den FCM's, die auch in der Abwesenheit von Alk vorhanden sind (Abb. 5.14 A-C). Der aktive, Alk vermittelte RTK-Signalweg führt über mehrere Zwischenschritte zur Phosphorylierung von ERK zu diphospho-ERK (dpERK). Mit Antikörpern, die spezifisch die dp-ERK Form erkennen, kann somit die Aktivität des Signalweges detektiert werden (Gabay et al., 1997). Neben der Expression in anderen Geweben ist dp-ERK auch im viszeralen Mesoderm vorhanden. Hier konnte es im Stadium 11 in der Zellreihe detektiert werden, welche die Founderzellen bilden (Pfeil in Abb. 5.17 A, B). Da Alk aber in allen Zellen des viszeralen Mesoderms exprimiert wird, wird die Begrenzung des aktiven RTK-Signalweges nicht durch die Lokalisation des Rezeptors in einer Subpopulation der viszeralen Zellen hervorgerufen, die dann später zu den Founderzellen werden. Es muß also einen anderen Mechanismus geben, der die Aktivierung des RTK-Signalweges auf die Founderzellen beschränkt.

Das Jeb-Protein, welches wahrscheinlich als Ligand für die RTK Alk dient, wird von den Zellen des somatischen Mesoderms exprimiert und von dort sekretiert (Weiss et al., 2001). So erreicht es zunächst die zukünftigen Founderzellen des viszeralen Mesoderms, die den Zellen des somatischen Mesoderms am nächsten sind. Doppelfärbungen mit Jeb- und Alk-Antikörpern zeigten, daß in der Wildtypsituation Jeb tatsächlich mit Alk an den Membranen der Founderzellen des viszeralen Mesoderms ko-lokalisiert. An den Membranen der FCM's war keine Kolokalisation zu beobachten (Abb. 5.17 E, F). Die Begrenzung des aktiven RTK-Signalweges scheint also durch das Jeb-Signal stattzufinden. Er wird anscheinend nur in den am weitesten ventral liegenden Zellen des viszeralen Mesoderms aktiviert, die das

Signal aus dem somatischen Mesoderm erhalten. Dies wurde auch dadurch bestätigt, daß dpERK in *jeb^{weli}* Mutanten nicht mehr im viszeralem Mesoderm vorhanden ist (Abb. 5.17 C, D). Der RTK-Signalweg ist hier nicht mehr aktiv.

In *mili^{Alk}* Mutanten, in denen die RTK im Zytoplasma fehllokalisiert ist, konnte das Jeb-Protein nicht an den Zellmembranen des viszeralem Mesoderms detektiert werden (Abb. 5.17 G, H). Dieser Befund ist ein weiterer Hinweis dafür, daß Jeb und Alk miteinander agieren und Jeb der Ligand für die RTK Alk ist.

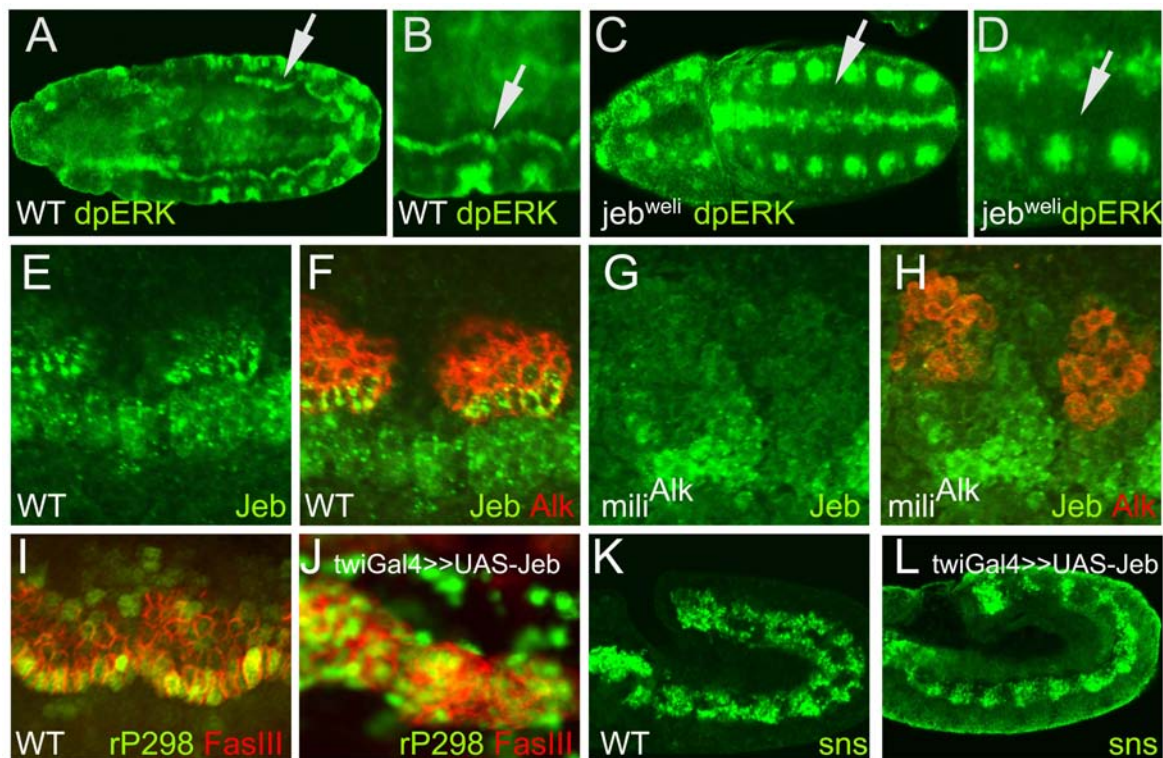


Abb. 5.17: Die Aktivierung der RTK *Mili^{Alk}* durch Jeb führt im viszeralem Mesoderm zur Determination der Founderzellen. Stadium 11 Embryonen wurden mit dpERK-Antikörpern zur Detektion eines aktiven RTK-Signalweges (grün in A-D), FasIII- (rot in I, J) zur Markierung aller Zellen des viszeralem Mesoderms, mit Alk- (rot in F, H) oder Jeb- (grün in E-H) Antikörpern gefärbt. Zur Markierung der Founderzellen wurde *rP298-lacZ* (grün in I, J) eingesetzt und die FCM's mit einer *sns in situ* Sonde (grün in K,L) detektiert. A-D In Wildtyp-Embryonen des Stadiums 11 ist dpERK neben anderen Geweben in einer Zellreihe im viszeralem Mesoderm vorhanden (Pfeil in A, B). Diese Expression ist in *jeb^{weli}* mutanten Embryonen nicht vorhanden (Pfeil in C, D). E-F In Wildtyp-Embryonen (E, F) wird Jeb durch die Alk exprimierenden Founderzellen des viszeralem Mesoderms aufgenommen. In *mili^{Alk}* Mutanten ist Jeb hingegen nicht an den Zellmembranen der Zellen lokalisiert (G, H). I-L Durch die Überexpression von Jeb im gesamten Mesoderm mit einem *twi-GAL4* Treiber werden alle Zellen des viszeralem Mesoderms in Founderzellen verwandelt (J). Bei *sns in situ* Hybridisierungen sind nur noch die FCM's des somatischen Mesoderms zu erkennen, während die FCM's des viszeralem Mesoderms fehlen (L).

5.12.2 Durch eine erhöhte Menge an Jeb-Ligand werden alle Zellen des viszerale Mesoderms zu Founderzellen

Um zu untersuchen, ob Jeb tatsächlich der limitierende Faktor bei der Aktivierung des RTK-Signalweges ist, wurden Überexpressionsexperimente mit Hilfe des *UAS-GAL4*-Systems (Brand und Perrimon, 1993; siehe auch Abschnitt 5.1) durchgeführt. Mit Hilfe einer *twist-GAL4*-Treiberlinie (*SG24-GAL4*) wurde *UAS-Jeb* (Weiss et al., 2001) im gesamten Mesoderm exprimiert. Der daraus resultierende Überschuß an Jeb-Signal führt dazu, daß alle Zellen des viszerale Mesoderms zu Founderzellen werden. Dies wurde besonders deutlich durch den Founderzellmarker *rP298-lacZ*, welcher die β -Galaktosidase-Expression in allen Zellen des viszerale Mesoderms dieser Embryonen bewirkt (Abb. 5.17 J). Außerdem war in *sns in situ* Hybridisierungen keine *sns* Expression in den Zellen des viszerale Mesoderms zu erkennen (Abb. 5.17 L). In der somatischen Muskulatur waren keine Effekte zu erkennen (Daten nicht gezeigt). Alle Zellen des viszerale Mesoderms sind also im Prinzip in der Lage, auf das Jeb-Signal zu reagieren und zu Founderzellen zu differenzieren. Die begrenzte Menge an Ligand scheint im Wildtyp dafür zu sorgen, daß nur die Zellen, die dem Ursprung des Signals am nächsten sind, dieses auch erhalten und zu Founderzellen werden. Alle anderen Zellen differenzieren zu FCM's.

Obwohl durch die Überexpression des Jeb-Signals alle Zellen des viszerale Mesoderms zu Founderzellen werden, entwickelte sich dieses weitgehend normal weiter. Der Mitteldarm wird vollständig umschlossen und auch die drei Darmkonstruktionen bilden sich korrekt aus. Diese Fähigkeit zur korrekten Muskelausbildung, auch wenn keine Fusionen stattfinden, ist eines der Charakteristika von Founderzellen. Von *sns* und *mbc* Mutanten ist bekannt, daß, obwohl auch hier keine Fusionen stattfinden, in der somatischen Muskulatur Mini-Muskeln gebildet werden, welche die richtige Orientierung und Anheftung aufweisen (Rushton et al., 1995; Bour et al., 2000). In Mutanten in denen die Founderzellen nicht korrekt ausdifferenziert sind, wie z.B. in *duff/kirre*, *irreC/rst* Doppelmutanten, ist dies nicht der Fall (Ruiz-Gómez et al., 2000). Hier werden keine Muskeln gebildet. Dies gilt auch für die Zellen in der viszerale Muskulatur (Klapper et al., 2002).

Durch die Jeb-Überexpression sind die Founderzellen im viszerale Mesoderm vorhanden und nur in ihrer Anzahl erhöht. Da diese in der Lage sind, auch ohne die Fusion mit den FCM's, die Muskeln korrekt auszubilden sind auch in diesen Embryonen keine Defekte im viszerale Mesoderm zu erkennen. Dasselbe Ergebnis wurde erzielt, wenn *UAS-Jeb* nur in den Zellen des viszerale Mesoderms überexprimiert wurde (Daten nicht gezeigt). Wie erwartet zeigt die Jeb-Überexpression keinen Phänotyp wenn man sie in *mil^{Alk}* Mutanten

durchführte, da keine funktionsfähige RTK vorhanden war, um das Signal weiterzuleiten (Daten nicht gezeigt). Dies ist wiederum ein Hinweis dafür, daß Alk tatsächlich für die Weiterleitung des Jeb-Signals verantwortlich ist und keine anderen Faktoren hier wirken.

5.13 Die Zellen des viszerale Mesoderms in *jeb^{weli}* und *mili^{Alk}* Mutanten differenzieren ausschließlich zu fusionskompetenten Myoblasten

Da die Zellen des viszerale Mesoderms in *jeb^{weli}* und *mili^{Alk}* Mutanten keine Founderzell-spezifischen Marker wie z.B. *rP298-lacZ* exprimieren und in FasIII-Antikörperfärbungen die globuläre Morphologie der FCM's zeigen, sollte untersucht werden, ob diese Zellen in der Tat zu FCM's ausdifferenzieren oder undifferenziert bleiben. Dazu wurden *in situ* Hybridisierungen mit einer DIG-markierten *sns* PCR-Einzelstrang-Sonde durchgeführt. *sns* wird im Wildtyp in den FCM's der somatischen und viszerale Muskulatur exprimiert (Bour et al., 2000; San Martin et al., 2001; Klapper et al., 2002). Im Stadium 11 sind die beiden Gruppen der FCM's in zwei Bändern entlang des Rumpfes der Embryonen angeordnet. Diese beiden Bänder sind leiterartig durch Zellgruppen miteinander verbunden. Das ventrale Band repräsentiert die FCM's des somatischen Mesoderms (Pfeil in Abb. 5.18 A), während das dorsale Band aus den FCM's des viszerale Mesoderms besteht (Pfeilspitze in Abb. 5.18 A). In *jeb^{weli}* und *mili^{Alk}* Mutanten ist nur noch eines der beiden Bänder vorhanden. Anhand der Lokalisation der verbindenden Zellgruppen ventral von diesem Band konnten diese verbleibenden FCM's dem viszerale Mesoderm zugeordnet werden (Abb. 5.18 B, C). Diese Zellen bleiben also in den beiden Mutanten nicht undifferenziert, sondern entwickeln sich zu FCM's und exprimieren FCM spezifische Gene.

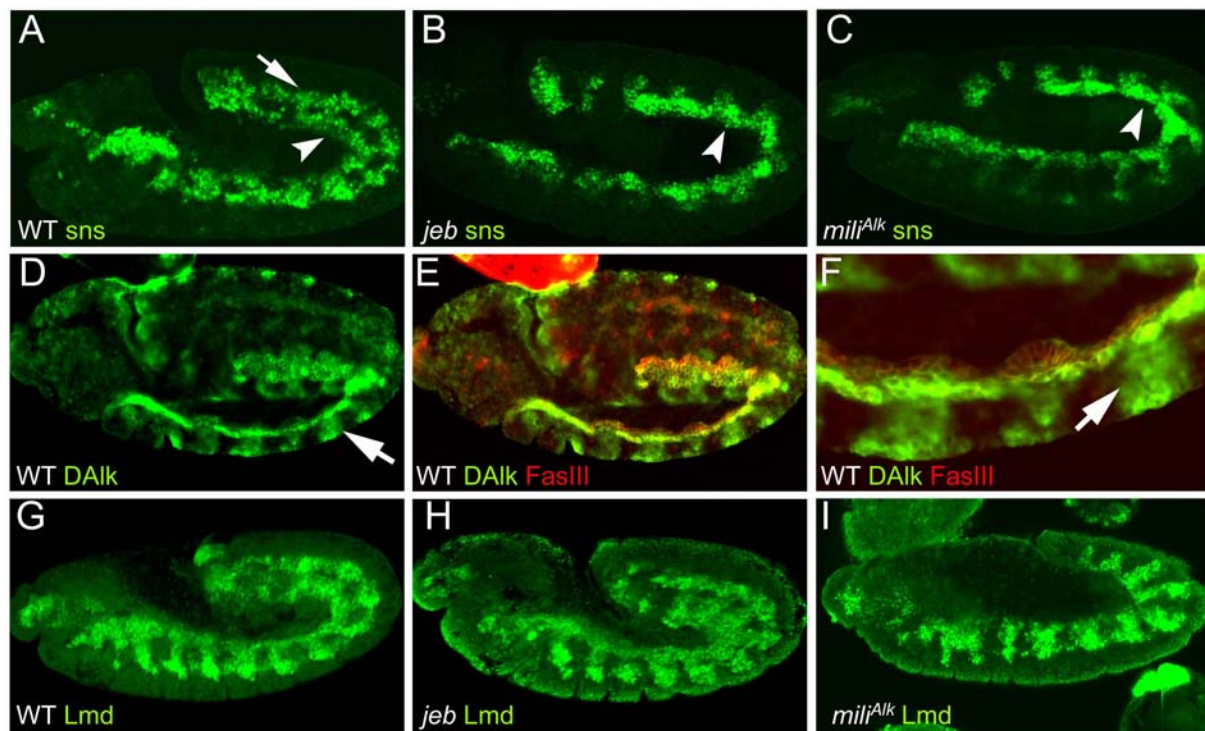


Abb. 5.18: In *jeb^{weli}* und *mili^{Alk}* Mutanten exprimieren die FCM's des viszeralen Mesoderms *sns*, während sich die FCM's des somatischen Mesoderms nicht differenzieren. **A-C** *sns* *in situ* Hybridisierungen an Stadium 11 Embryonen markieren im Wildtyp die FCM's des viszeralen (dorsal; Pfeilspitze) und somatischen (ventral; Pfeil) Mesoderms (**A**). In *jeb^{weli}* (**B**) und *mili^{Alk}* (**C**) Mutanten fehlt das Band der FCM's des somatischen Mesoderms, während die viszerale FCM's vorhanden sind (Pfeilspitze in **B**, **C**). **D-F** Gezeigt ist die Alk- (grün) und FasIII- (rot in **E**, **F**) Expression in Stadium 11 Wildtyp-Embryonen. Neben der Expression im viszeralen Mesoderm ist Alk vorübergehend in einigen Zellen des Neuroektoderms und Zellgruppen des somatischen Mesoderms (Pfeil in **D**, **F**) exprimiert. **G-I** Gezeigt ist die Lmd-Expression in Stadium 12 Embryonen. In Wildtyp-Embryonen (**G**) ist Lmd in zwei Bändern in den FCM's des somatischen und viszeralen Mesoderms exprimiert. In *jeb^{weli}* (**H**) und *mili^{Alk}* (**I**) ist die Expression in beiden Zellpopulationen vorhanden.

5.14 Jeb und Alk sind für die Differenzierung der fusionskompetenten Myoblasten in der somatischen Muskulatur essentiell

In den *jeb^{weli}* und *mili^{Alk}* Mutanten differenzieren die Zellen des viszeralen Mesoderms zu FCM's und exprimieren charakteristische Gene wie z.B. *sns* (siehe Abschnitt 5.13; Abb. 5.18 B, C). Interessanterweise waren die *sns* positiven Zellen des viszeralen Mesoderms die einzigen, die in den Mutanten detektiert werden konnten. Die FCM's des somatischen Mesoderms fehlen. Da bislang keine Expression von Alk in der somatischen Muskulatur beschrieben wurde, war dieser Phänotyp sehr erstaunlich. Nähere Untersuchungen zeigten jedoch, daß Alk zusätzlich zu der Expression im viszeralen Mesoderm kurzfristig im Stadium 10 und 11 auch in der somatischen Muskulatur exprimiert wird (Abb. 5.18 D-F). Diese

Expression war nur in jeweils einer Zellgruppe pro Hemisegment zu beobachten (Pfeil in Abb. 5.18 D, F) und es ist anzunehmen, daß diese Expression für die Entwicklung der somatischen FCM's wichtig ist.

Ein anderer FCM-spezifischer Faktor, der Transkriptionsfaktors *lame duck/myoblast incompetent/gleeful* (*lmd/minc/glee*, im Folgenden als *lmd* bezeichnet), wird in den FCM's des somatischen und viszerale Mesoderms exprimiert und ist dort für die Determination der FCM's zuständig. *Lmd* ist im Wildtyp in einem ähnlichen Muster wie *Sns* exprimiert und kann im Stadium 11 in zwei Bändern entlang des Rumpfes detektiert werden (Duan et al., 2001; Furlong et al., 2001; Ruiz-Gómez et al., 2002). Das ventrale Band repräsentiert wiederum die FCM's des somatischen Mesoderms, während das dorsale Band aus den FCM's des viszerale Mesoderms besteht. Beide Bänder sind durch Zellgruppen miteinander verbunden (Abb. 5.18 G). In den *jeb^{weli}* und *mili^{Alk}* Mutanten ist *Lmd* in beiden Zellpopulationen vorhanden. Die Expression im somatischen Mesoderm ist allerdings leicht reduziert (Abb. 5.18 H, I). Der RTK Signalweg, welcher durch den Rezeptor *Alk* und seinen Liganden *Jeb* vermittelt wird, ist also im somatischen und viszerale Mesoderm für unterschiedliche Entwicklungsprozesse erforderlich. Während er im viszerale Mesoderm für die Determination der Founderzellen zuständig ist, wird er im somatischen Mesoderm für die korrekte Differenzierung der FCM's benötigt. Hier scheint er nicht für den Determinationsschritt zuständig zu sein, da die FCM's korrekt determiniert sind, wie die *Lmd*-Färbungen zeigen, sondern für die nachfolgende Ausdifferenzierung der Zellen.

5.15 Die fusionskompetenten Myoblasten des viszerale Mesoderms können an der Ausbildung des somatischen Mesoderm teilnehmen

Der Verlust der *Sns*-Expression in den FCM's der somatischen Muskulatur ruft in der Regel einen starken Fusionsdefekt hervor. Das zur Immunoglobulin-Familie gehörende, membranständige Protein wird zur Zell-Zell Erkennung zwischen Founderzellen und FCM's in den frühen Stadien des Fusionsprozesses benötigt. Bei dem Verlust von *Sns* in den FCM's finden daher keine Fusionen statt und die Founderzellen des somatischen Mesoderms bilden nur sogenannte Mini-Muskeln aus (Bour et al., 2000).

Da der größte Teil der FCM's in der somatischen Muskulatur in *jeb^{weli}* und *mili^{Alk}* mutanten Embryonen kein *Sns* exprimiert, wurde in diesen Mutanten ein starker Fusionsphänotyp erwartet, wie er auch in *sns* Mutanten beobachtet werden kann (Bour et al.,

2000). Die FCM's, die im ersten Fusionsschritt mit den Founderzellen fusionieren, beginnen nach der Fusion auch den Founderzellmarker *rP298-lacZ* zu exprimieren (Ruiz-Gómez et al., 2000). β -Galaktosidase-Antikörperfärbungen an Mutanten, die den Founderzellmarker *rP298-lacZ* tragen, zeigten keine Abnormalitäten in der Zahl der Founderzellen (Abb. 5.14 J-L). Daher ist es wahrscheinlich, daß dieser erste Fusionsschritt statt findet. Färbungen mit β 3-Tubulin-Antikörpern (Leiss et al., 1988) zeigten zudem nur leichte Fusionsdefekte in den dorsalen und ventralen Muskeln (Abb. 5.19 B, C). Diese leichten Fusionsdefekte äußern sich in unfusionierten Myoblasten und langen dünnen Projektionen der Muskelzellen (Pfeile in Abb. 5.19 B, C). Abgesehen davon waren teilweise starke lokale Defekte zu beobachten, die aber wahrscheinlich auf das fehlende viszerale Mesoderm zurückzuführen sind und durch austretenden Dotter hervorgerufen werden.

Die FCM's des viszeralen Mesoderms in *jeb^{weli}* und *mili^{Alk}* Mutanten exprimieren weiterhin Sns, während in den *sns* Mutanten die Expression in beiden FCM Populationen fehlt (Bour et al., 2000). Um zu überprüfen, ob die FCM's des viszeralen Mesoderms eventuell den Verlust der FCM's in der somatischen Muskulatur ausgleichen können, sollte das Schicksal dieser Zellen in den beiden Mutanten verfolgt werden. Anti-FasIII-Antikörperfärbungen eignen sich hierzu nicht, da die Expression nach dem Stadium 11 in den Mutanten nicht mehr stark genug ist, um den viszeralen Zellen zu folgen. Daher wurde das Schicksal der Zellen des viszeralen Mesoderms mit dem Marker *bagpipe-lacZ* (*bap-lacZ*) untersucht. *bap-lacZ* ist im Wildtyp während der gesamten Embryonalentwicklung nur in den Zellen des viszeralen Mesoderms exprimiert (Azpiazu und Frasch, 1993; Zaffran et al., 2001) (Abb. 5.19 D). In *jeb^{weli}* und *mili^{Alk}* Mutanten, die diesen Marker tragen, konnte die β -Galaktosidase-Expression ab dem späten Stadium 12 in der somatischen Muskulatur detektiert werden. Die so markierten Zellen waren hier am häufigsten in den lateralen Bereichen zu erkennen (Abb. 5.19 E, F). Diese Bereiche sind den FCM's des viszeralen Mesoderms am nächsten. Die in der viszeralen Muskulatur aufgrund der fehlenden Founderzellen nicht mehr benötigten FCM's sind anscheinend in der Lage, den Verlust der Sns-exprimierenden Zellen in der somatischen Muskulatur auszugleichen. Die FCM's sind daher nicht spezifisch für eines der beiden mesodermalen Gewebe.

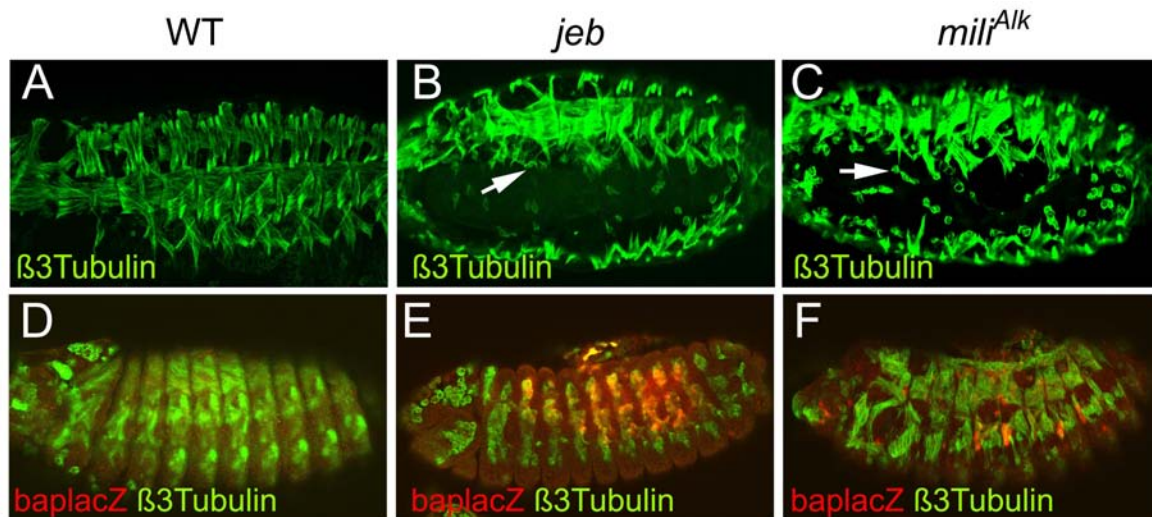


Abb. 5.19: Die Zellen des viszeralen Mesoderms von *jeb^{weli}* und *mili^{Alk}* Mutanten werden in die somatische Muskulatur aufgenommen. Die ventrolateralen (A-C) bzw. lateralen (D-F) Muskeln von Stadium 16 Embryonen werden durch $\beta 3$ -Tubulin-Expression markiert (grün in A-F). Die Zellen des viszeralen Mesoderms sind durch *bap-lacZ* markiert (rot in D-F). A-C Vergleichen mit dem Wildtyp (A) sind die ventralen somatischen Muskeln in *jeb^{weli}* (B) und *mili^{Alk}* (C) Mutanten dünner, zeigen lange dünne Projektionen und es sind unfusionierte Myoblasten vorhanden (Pfeile in B, C). D-F in Wildtyp Embryonen kann keine *bap-lacZ*-Expression im somatischen Mesoderm detektiert werden (Stadium 14; D). Im Gegensatz dazu zeigen Stadium 14 *jeb^{weli}* (E) und *mili^{Alk}* (F) mutante Embryonen *bap-lacZ*-Expression in den lateralen somatischen Muskeln.

5.16 Die ektopische Expression von *UAS-Alk* im gesamten Mesoderm bewirkt den gleichen Phänotyp wie in *jeb^{weli}* und *mili^{Alk}* Mutanten

Anti-Alk-Antikörperfärbungen an Embryonen haben gezeigt, daß die RTK in allen Zellen des viszeralen Mesoderms, einigen neuroektodermalen Zellen und vorübergehend in einigen Zellen des somatischen Mesoderms exprimiert ist (Abb. 5.18 D-F). Um herauszufinden, welchen Einfluß die Überexpression von Alk im viszeralen oder im gesamten Mesoderm hat, wurde wiederum das *UAS-GAL4* System benutzt (siehe 4.15).

Erstaunlicherweise resultierte die ektopische Expression von *UAS-Alk* (Lóren et al., 2001) im gesamten Mesoderm mit einem *twi-GAL4*-Treiber (*SG24-GAL4*, A. Michelson, nicht publiziert) in dem gleichen Phänotyp wie in den *loss of function* Mutationen *jeb^{weli}* und *mili^{Alk}* (Abb. 5.14). Im Stadium 11 waren in den FasIII-Antikörperfärbungen nur Zellen zu erkennen, die die Morphologie der FCM's zeigen (Abb. 5.20 D) und später ist kein viszerales Mesoderm vorhanden (Daten nicht gezeigt). *sns in situ* Hybridisierungen bestätigten, daß die Zellen des viszeralen Mesoderms zu FCM's ausdifferenzieren. Wie in den Mutanten fehlt

jedoch auch in dieser Überexpressionssituation die *sns* Expression in den Zellen des somatischen Mesoderms (Abb. 5.20 E). Die Defekte in den somatischen Muskeln, die mit einer β 3-Tubulin-Färbung sichtbar gemacht wurden, sind deutlich stärker als in den Mutanten. Viele Muskeln sind kleiner und haben eine spindelförmige Morphologie mit langen, dünnen Fortsätzen (Abb. 5.20 F). Dies deutet darauf hin, daß nur wenige Myoblasten fusionieren, um diese Muskeln zu bilden.

Warum die ektopische Expression von *UAS-Alk* den gleichen Phänotyp ergibt, wie die *loss of function* Mutation des Gens kann nur vermutet werden. Es ist anzunehmen, daß die Defekte im viszeralem Mesoderm einen sekundären Effekt darstellen und nicht aus der Überexpression von Alk in diesem Gewebe resultieren. Hierfür spricht, daß die Zahl der Founderzellen im viszeralem Mesoderm durch Überexpression von Alk nur in diesem Gewebe durch einen *bap-GAL4*-Treiber ungefähr verdoppelt und ihre Differenzierung nicht komplett unterdrückt wird (Abb. 5.20 G, H). Diese Erhöhung der Zahl der Founderzellen resultiert wahrscheinlich daraus, daß der Überschuß an Rezeptor größere Mengen des Liganden abfangen kann und so mehr Zellen den RTK-Signalweg aktivieren und zu Founderzellen werden.

Die Defekte, die durch die Überexpression im gesamten Mesoderm hervorgerufen werden, könnten also durch eine Verringerung an verfügbarem Ligand hervorgerufen werden. Dies wurde mit Jeb-Antikörperfärbungen überprüft. Im Stadium 10 wird Jeb im Wildtyp in zwei Bändern im somatischen Mesoderm exprimiert. Im Stadium 12 kann es aber nicht mehr in mesodermalen Geweben nachgewiesen werden (Weiss et al., 2001; Abb. 5.20 I). In Embryonen, die Alk im gesamten Mesoderm ektopisch exprimierten, ist diese Jeb-Expression im Stadium 11 stark reduziert und bleibt nur in einer kleinen Gruppe pro Hemisegment bestehen (Abb. 5.20 J). Die Alk-Überexpression phänotoppiert also die Situation der *jeb* Mutation.

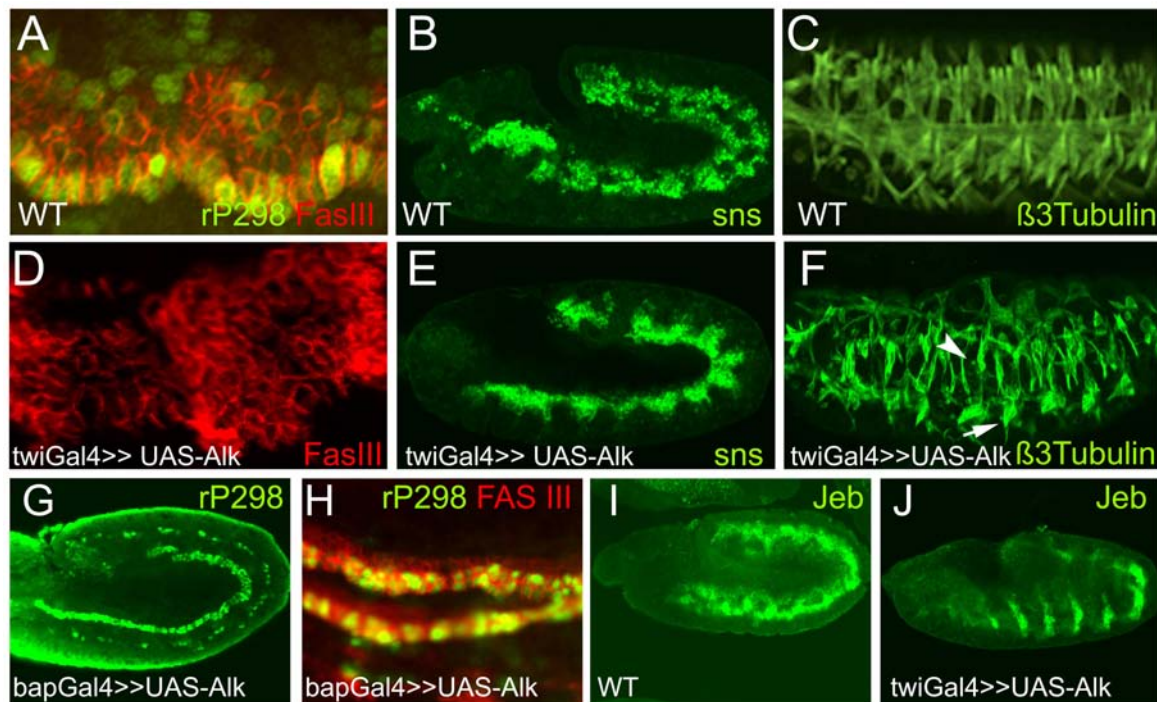


Abb. 5.20: Die Überexpression von Alk im gesamten Mesoderm resultiert im gleichen Phänotyp wie in *jeb^{weli}* und *mili^{Alk}* Mutanten. Wildtyp-Embryonen werden in A-C und I gezeigt. *UAS-Alk* wurde mit einer *twi-GAL4* (D-F, J) oder *bap-GAL4* (G, H) Treiberlinie überexprimiert. Founderzellen sind mit *rP298-lacZ* markiert (grün in A, H). FCM's sind durch *sns in situ* Hybridisierungen (grün in B, E) somatische Muskeln durch β3-Tubulin-Antikörper (grün in C, F) und das viszerale Mesoderm mit FasIII-Antikörper (rot in A, D, H) markiert. D-F In Embryonen in denen *UAS-Alk* im gesamten Mesoderm ektopisch exprimiert wird, können keine Founderzellen in der viszeralen Muskulatur beobachtet werden (Stadium 11; D). Auch die FCM's des somatischen Mesoderms fehlen (Stadium 11; E). Die dorsalen und ventralen somatischen Muskeln zeigen im Stadium 16 einen starken Fusionsphänotyp mit langen dünnen Projektionen (Pfeil in F) und unfusionierten Myoblasten (Pfeilspitze in F). J, K Wenn *UAS-Alk* nur im viszeralen Mesoderm überexprimiert wird, ist die Zahl der Founderzellen im Stadium 11 etwa verdoppelt (Vergleiche mit A). In H ist das viszerale Mesoderm von beiden Hälften des Embryos gezeigt. I, J Im Wildtyp des Stadiums 11 (I) wird Jeb in einem kontinuierlichen Band im Mesoderm exprimiert. Das Signal wird durch die Überexpression von *UAS-Alk* im gesamten Mesoderm reduziert (J).

5.17 Analyse der Funktion von Alk in Wirbeltierzellen

Durch die Untersuchung des im Screen identifizierten *Drosophila* Homologs von Alk, *mil^{Alk}*, konnten in der bisherigen Arbeit erste Erkenntnisse über die Funktion und Wirkungsweise dieses Faktors in *Drosophila* erhalten werden. Das humane Homolog der RTK Alk wurde in einer Translokation identifiziert, die an der Ausbildung von Anaplastic large cell Lymphomen beteiligt ist (Übersichtsartikel: Duyster et al., 2001; Pulford et al., 2004). In Mäusen konnte bislang eine Expression in dem sich entwickelnden Nervensystem und Gehirn der Embryonen (Iwahara et al., 1997; Morris et al., 1997), sowie in einzelnen neuronalen Zellen im adulten, humanen Gehirn nachgewiesen werden (Pulford et al., 1997). Die normale Rolle von Alk in der Entwicklung ist nicht bekannt. Erste Hinweise lieferten Zellkulturexperimente mit einer neuronalen Zell-Linie, bei welcher durch die Expression einer aktivierten Form von Alk die neurale Differenzierung induziert werden konnte (Souttou et al., 2001).

Um weitere Hinweise auf Funktion von Alk in Säugetieren zu erhalten, sollte in dieser Arbeit getestet werden, ob eine aktivierte Form von Alk ebenfalls in der Lage ist, die myogene Differenzierung in einer entsprechenden Zell-Linie zu induzieren. Dazu wurden Zellkulturexperimente mit einer myogenen Zell-Linie (C2C12, Lindsell et al., 1995) bzw. einer Fibroblasten-Zell-Linie (C3H10T1/2, Moltekin et al., 1995) durchgeführt. Die C2C12-Zellen bilden mehrkernige Myotuben nach Entfernen der Wachstumsfaktoren aus, während die C3H10T1/2-Zellen für diesen Entwicklungsschritt mit einem MyoD-Konstrukt (Davis et al., 1987) transfiziert werden müssen. Die Zellkulturexperimente erfolgten während eines Forschungsaufenthalts im Labor von Ruth Palmer in Umea, Schweden. Aufgrund der Kürze des Aufenthalts konnten die im Folgenden beschriebenen Transfektionen an den Zell-Linien nur einmal erfolgreich durchgeführt werden. Die erhaltenen Ergebnisse sind daher nicht mehrfach reproduziert worden. Diese Experimente sind als Etablierung der Technologie zu betrachten.

5.17.1 Bestimmung der Abhängigkeit der Myoblastendifferenzierung von der Serumkonzentration

Vorangegangene Arbeiten haben gezeigt, daß C2C12-Zellen zu Myotuben differenzieren, wenn sie entweder in Medium, in welchem das Fetal Calf Serum (FCS) durch Horse Serum (HS) ersetzt wurde oder in Serum-freien Medium kultiviert wurden. Dagegen erfolgte in Gegenwart von 10 % FCS die weitere Teilung der Zellen und es kommt nicht zur Differenzierung (Yoshiko et al., 1996; Lawson und Purslow, 2000). Daher sollte zunächst der Schwellenwert von FCS bestimmt werden, bei dem die C2C12-Zellen noch zu Myotuben differenzieren. Ebenso sollte die optimale Menge an MyoD zur Induktion der myogenen Differenzierung in den C3H10T1/2-Zellen bestimmt werden.

Hierzu wurden die C2C12-Zellen sieben Tage in Differenzierungsmedium kultiviert, welches 0 bis 10 % FCS bzw. 10 % HS enthielt. Die C3H10T1/2-Zellen wurden mit unterschiedlichen Mengen des MyoD-Konstruktes (Davis et al., 1987) transfiziert (0-2 µg Plasmid pro 35 mm Kulturschale) und in Differenzierungsmedium kultiviert. Nach sieben Tagen wurden die Zellen beider Zell-Linien lysiert und die Proteine mittels SDS-PAGE und Western-Blot-Analyse untersucht. Da die differenzierten Myotuben im Gegensatz zu den undifferenzierten Zellen Myosin Heavy chain (Mhc) exprimieren sollten (Moltekin et al., 1995), wurden die unterschiedlichen Gesamtzellproteinextrakte auf ihren Gehalt an Mhc analysiert.

Erstaunlicherweise zeigten alle Proteinextrakte der C2C12-Zellen nach sieben Tagen im Western-Blot eine Expression von Mhc (Abb. 5.21). Offensichtlich waren alle Zellen zumindest so weit differenziert, daß sie Mhc exprimieren. Dies lag vermutlich daran, daß die Zellen, wenn sie nicht zur Differenzierung angeregt werden, sich weiter teilen und so 100 % Konfluenz erreichen. Diese hohe Zelldichte bewirkt offensichtlich, daß die Zellen unabhängig vom Medium zu differenzieren beginnen und Myotuben spezifische Gene, wie z. B. Mhc exprimieren (The American Type Culture Collection (ATCC)-Katalog: <http://www.lgcpromochem.com/atcc/>). Gleiche Ergebnisse wurden in den anti-Mhc-Antikörperfärbungen von in GM kultivierten und fixierten Zellen erhalten. Im Gegensatz zu den Zellen die im DM Medium kultiviert wurden, fusionierten die Zellen jedoch nicht. Nur vereinzelt konnten Zellen mit zwei Zellkernen beobachtet werden, die sich jedoch wahrscheinlich gerade im Übergang Telophase zu Zytokinese befanden (siehe Abb. 5.24 G). Nach einer kürzeren Differenzierungsdauer von nur drei Tagen war kein Mhc in den Zellen detektierbar (Abb. 5.21; 5 % FCS 3 Tage). Es konnte daher keine kritische Konzentration an Serum festgestellt werden, die gerade noch ausreichend ist, um die Differenzierung der Zellen

zu blockieren. Um die, durch zu hohe Zelldichte bewirkte Differenzierung der Zellen auszuschließen, sollte daher in folgenden Experimenten darauf geachtet werden, daß die Zellen während der siebentägigen Differenzierung maximal 90 % Konfluenz erreichen.

Im Gegensatz zu den C2C12-Zellen zeigten die C3H10T1/2-Zellen auch nach der Transfektion mit MyoD in unterschiedlichen Konzentrationen nach siebentägiger Differenzierung und Erreichen von 100 % Konfluenz keine Mhc-Expression (Abb. 5.21).

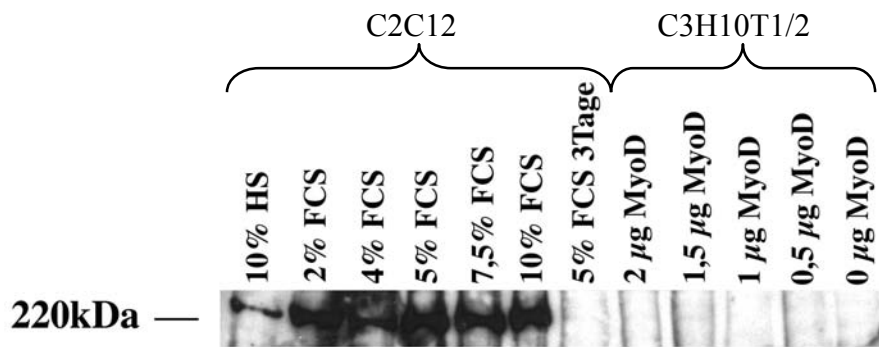


Abb. 5.21: Bestimmung des Gehalts an Mhc in C2C12- bzw. C3H10T1/2-Zellen. Die C2C12-Zellen wurden sieben Tage in DM mit unterschiedlichen Konzentrationen an Fetal Calf Serum (FCS) bzw. in 10 % Horse Serum (HS) kultiviert. Die C3H10T1/2-Zellen wurden zunächst mit unterschiedlichen Mengen an MyoD transfiziert und ebenfalls sieben Tage in DM kultiviert. Die Kultivierung erfolgte jeweils in Kulturgefäßen mit einem Durchmesser von 35 mm. Danach wurden die Zellen lysiert, die Proteine extrahiert, auf einem 7,5 % Acrylamidgel aufgetrennt und der Gehalt an Mhc mittels Western-Blot-Analyse untersucht. Während die C2C12-Zellen bei allen Serumkonzentrationen Mhc exprimieren, konnte diese in den C3H10T1/2-Zellen nicht beobachtet werden.

5.17.2 Transfektion der Zell-Linien mit Alk

Die beiden Zell-Linien wurden mit unterschiedlichen Alk-Konstrukten transfiziert, um zu untersuchen, ob aktivierte (Alk^{FL} oder RPTP-Alk) oder dominant-negative Formen (Alk^{EC} oder dnAlk) der RTK in der Lage sind, die Differenzierung der Zellen zu beeinflussen. Hierzu wurden die in Abb. 5.22 gezeigten Konstrukte verwendet. Die Überexpression des Alk^{FL} -Konstruktes wirkt dabei vermutlich ähnlich wie die Präsenz einer aktivierten Form von Alk, da die resultierende große Dichte an RTK in der Zelle wahrscheinlich auch ohne Liganden zu Dimerisierungen führt, welche eine Aktivierung der RTK bewirken (R. Palmer, persönliche Mitteilung). Neben diesen drei Konstrukten mit *Drosophila Alk* wurde zudem eine dominant-negative Form des Maus-Homologs von *Alk* verwendet (dnAlk), die denselben Aufbau wie Alk^{EC} (Abb. 5.22 C) zeigt. Die drei *Drosophila*-Konstrukte lagen im Vektor pcDNA3 vor, während dnAlk in pIRES kloniert war.

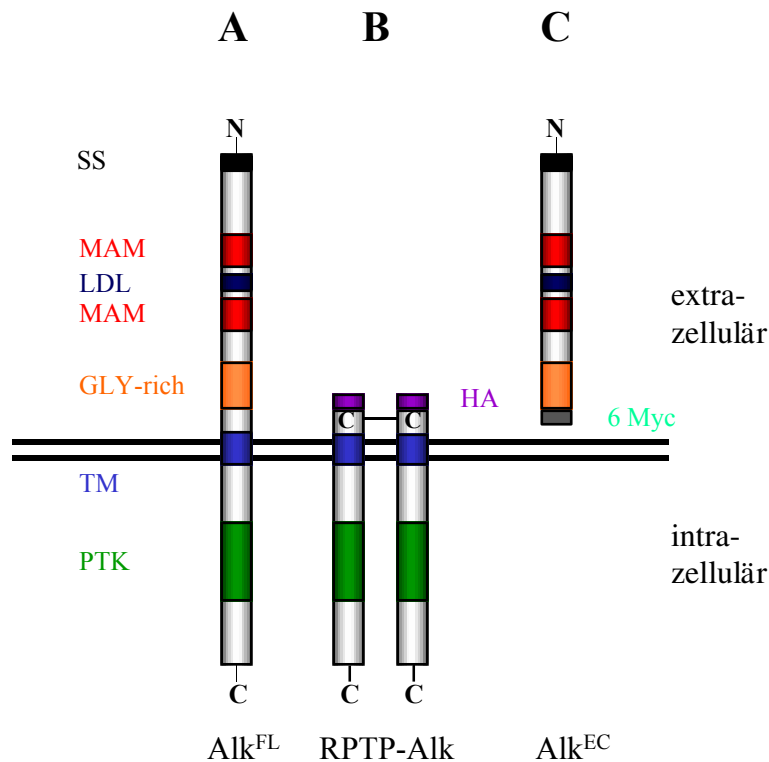


Abb. 5.22: Konstrukte zur Transfektion der Maus-Zell-Linien. A Alk^{FL} : komplette cDNA von *Drosophila Alk* mit N-terminaler Signalsequenz (SS, schwarz), zwei MAM-Domänen (MAM, rot), einer LDL-Domäne, die zur Bindung an den Liganden notwendig ist (LDL, dunkelblau), einer Glycin-reichen Region (GLY-rich, orange), einer Transmembran-Domäne (TM, blau) sowie einer intrazellulären Phosphotyrosin-Kinase (PTK, grün). B RPTP-Alk: aktivierte Form von *Alk* in der zwei intrazelluläre Teile von *Alk*, inklusive Transmembrandomäne über eine Disulfid-Bindung zweier Cystein-Reste miteinander verbunden sind, was zu einer konstitutiven Aktivierung der PTK führt. Das Konstrukt trägt zudem einen HA-Tag (violett). C Alk^{EC} : extrazelluläre Domäne von *Alk* ohne die Transmembrandomäne. Diese wirkt als dominant-negative Form und trägt sechs Myc-Tags (grau). Alle Konstrukte lagen im Säugetierexpressions-Vektor pcDNA3 vor.

Die Transfektion der beiden Zell-Linien mit diesen Konstrukten zeigte nach siebentägiger Differenzierung in Medium mit 5 % FCS (C2C12-Zellen) bzw. ohne die gleichzeitige Transfektion mit MyoD (C3H10T1/2-Zellen) keinerlei Auswirkungen auf die Mhc-Bildung in Western-Blot-Analysen. In den C2C12-Zellen konnte keine Reduktion der Mhc-Expression festgestellt werden, während die C3H10T1/2-Zellen auch nach der Transfektion mit den Alk-Konstrukten keine Mhc-Expression zeigten (Abb. 5.23). Um zu testen, ob durch die Transfektion eventuell die Mhc-Expression in früheren Stadien in den C2C12-Zellen beeinflusst wird, wurden ebenfalls Gesamtproteinextrakte, die 3 Tage nach der Transfektion erhalten wurden, auf ihre Mhc Expression untersucht. Hier konnte keinerlei Mhc-Expression detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

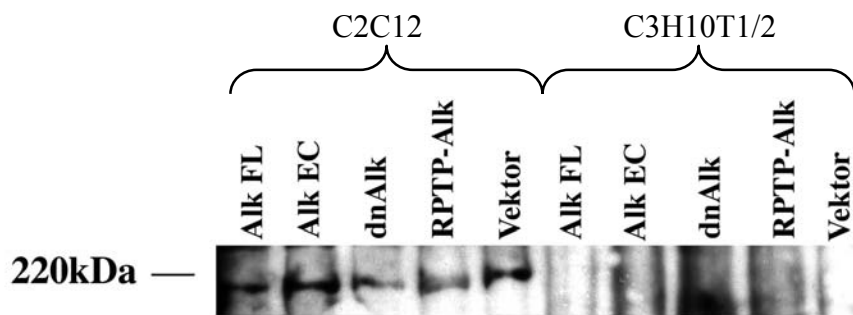


Abb. 5.23: Die Transfektion der C2C12- bzw C3H10T1/2-Zellen mit unterschiedlichen Alk-Konstrukten verursacht keine im Western-Blot detektierbare Veränderung der Mhc-Expression. Die Zellen wurden mit den unterschiedlichen Alk-Konstrukten transfiziert und anschließend sieben Tage kultiviert (C2C12 in DM mit 5 % FCS; C3H10T1/2 in DM). Nach der Lyse der Zellen wurden die Proteine extrahiert, auf einem 7,5 % Acrylamidgel aufgetrennt und einer Western-Blot-Analyse mit anti-Mhc-Antikörpern unterzogen. Die C2C12-Zellen exprimieren weiterhin Mhc, während die C3H10T1/2-Zellen auch nach der Transfektion mit den unterschiedlichen Alk-Konstrukten keine detektierbare Mhc-Expression zeigten.

Im Fluoreszenzmikroskop wurden die Zellen, die mit dem Vektor pIRES oder dem dnAlk Konstrukt transfiziert waren, auf die durch den Vektor hervorgerufene GFP-Expression hin untersucht. Es zeigte sich, daß nur ca. 10 % der Zellen GFP exprimierten. Die übrigen 90 % schienen nicht effektiv transfiziert worden zu sein. Allerdings konnte in Western-Blot-Analysen Alk^{FL}, Alk^{EC} sowie dnAlk detektiert werden, was auf eine effektive Transkription der Konstrukte in zumindest einem Teil der Zellen hindeutet. Eine Expression der aktivierten Form von Alk (RPTP-Alk) konnte allerdings nicht nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Um trotz der geringen Transfektionseffizienz Aussagen über mögliche Einflüsse der Alk-Konstrukte auf die Ausbildung der Myotuben machen zu können, wurden die Zell-Linien auf Deckgläschen kultiviert und einer anti-Mhc-Antikörperfärbung unterzogen. Hier zeigte sich, dass nur ca. 2-3 % der C3H10T1/2-Zellen nach der MyoD-Transfektion Mhc exprimierten. Die Transfektionseffizienz dieses Konstruktes scheint also ebenfalls sehr gering zu sein. Gleichzeitig wurden die Zellen, die erfolgreich mit den Alk-Konstrukten transfiziert wurden, durch eine anti-Alk-Antikörperfärbung (Alk^{FL} und Alk^{EC}) bzw. eine Antikörperfärbung gegen einen im Konstrukt enthaltenen HA-Tag (RPTP-Alk und dnAlk) sichtbar gemacht. Hierbei bestätigte sich, daß bei allen Konstrukten die Effizienz relativ gering war. Lediglich die Alk^{EC}- und dnAlk-Konstrukte zeigten eine Transfektionseffizienz von ca. 10 %. Beim Alk^{FL}-Konstrukt lag sie bei nur ca. 3 %, während nur sehr wenige mit RPTP-Alk transfizierten Zellen identifiziert werden konnten. Diese waren in der Regel sehr klein und wiesen eine abgerundete Morphologie auf. Dies erklärt wahrscheinlich auch warum RPTP-Alk im Western-Blot im Gegensatz zu den anderen Konstrukten nicht detektiert

werden konnte. Aufgrund der geringen Transfektionseffizienz stellten die untransfizierten Zellen die größte Menge an Protein. Vermutlich konnten daher keine Auswirkungen der Konstrukte auf die Mhc-Expression in den einzelnen Zellkulturen in den Western-Blot-Analysen beobachtet werden.

In den Antikörperfärbungen konnte man neben den Erkenntnissen über die Transfektionseffizienz auch feststellen, ob die Transfektion mit den unterschiedlichen Konstrukten Einfluß auf die Ausdifferenzierung der Myotuben hat. In Differenzierungsmedium kultivierte C2C12-Zellen zeigten keine durch die Expression von Alk^{FL}, Alk^{EC} und dnAlk hervorgerufenen Auswirkungen auf die Ausbildung der Myotuben. Es konnten fusionierte, Mhc-positive Myotuben mit mehreren Zellkernen detektiert werden, welche die jeweiligen Konstrukte exprimierten (Abb. 5.24 A - F, dnAlk nicht gezeigt). In den C3H10T1/2-Zellen konnte aufgrund der geringen Transfektionseffizienz keine Doppeltransfektion mit dem MyoD-Konstrukt und den unterschiedlichen Alk-Konstrukten erreicht werden. Daher konnte der Einfluß der Konstrukte auf die differenzierten C3H10T1/2-Zellen nicht untersucht werden.

Wurden die mit Alk^{FL} oder RPTP-Alk transfizierten C2C12- oder C3H10T1/2-Zellen allerdings in Wachstumsmedium kultiviert, in denen keine Fusion zu mehrkernigen Myotuben stattfindet, so zeigten sie eine von den nicht transfizierten Zellen abweichende Morphologie, die eher an ausdifferenzierte Neuroblasten erinnerte. Diese Zellen exprimierten außerdem kein Mhc (Abb. 5.24 G - L).

Mit Alk^{EC} transfizierte, undifferenzierten C2C12-Zellen hatten eine normale Morphologie und Mhc-Expression (Daten nicht gezeigt). Erstaunlicherweise konnte in den C3H10T1/2-Zellen, die normalerweise keinerlei Mhc-Expression zeigen, diese durch die Expression des Alk^{EC}-Konstruktes in einigen Zellen induziert werden (Abb. 5.24 M - O). Durch die Expression des dnAlk-Konstruktes wurde, wie schon bei Alk^{EC}, keine Änderung der Morphologie der undifferenzierten C2C12- bzw. C3H10T1/2-Zellen hervorgerufen. Eine Aussage über die Mhc-Expression konnte aufgrund der durch den Vektor hervorgerufenen GFP-Expression nicht gemacht werden.

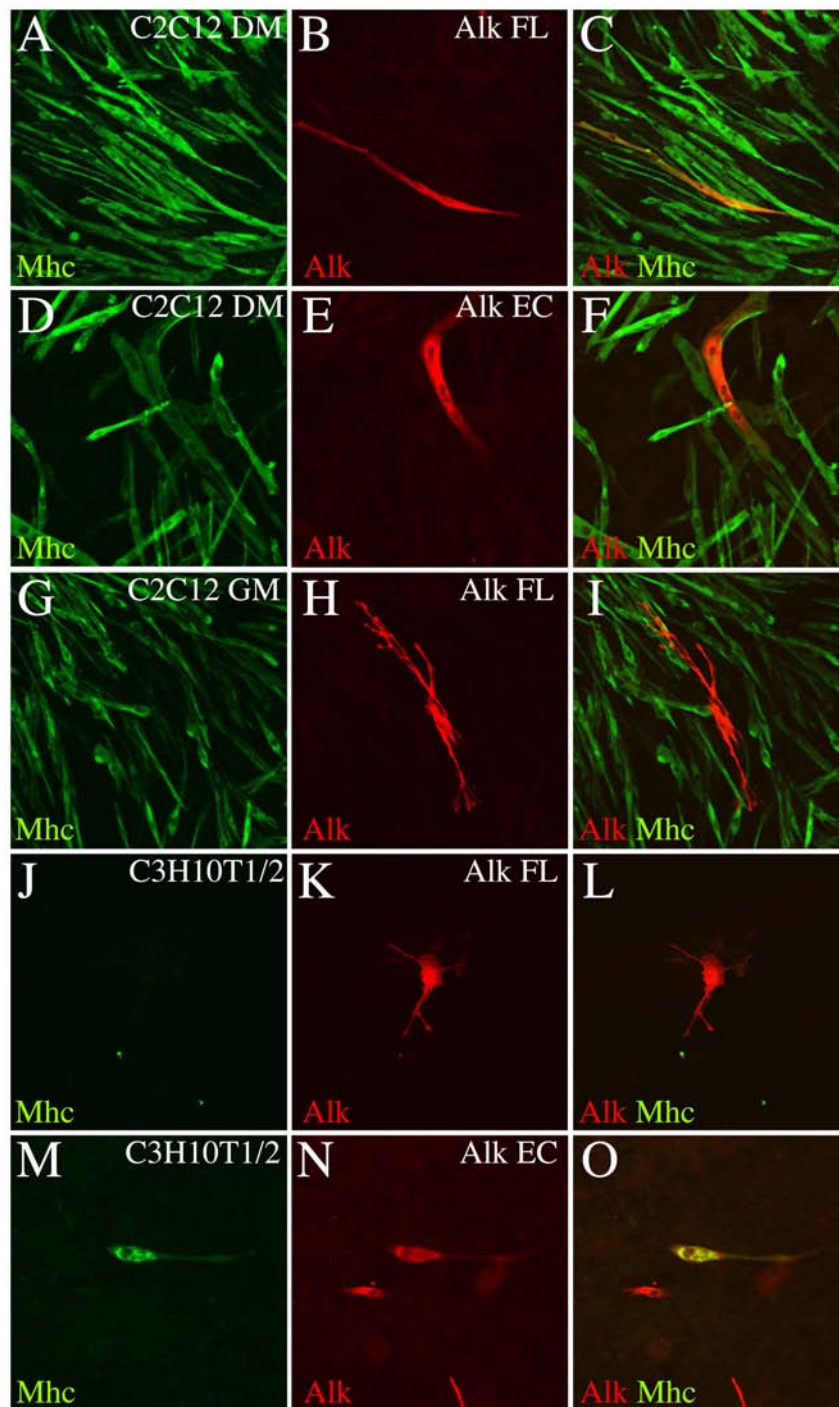


Abb. 5.24: Die Alk-Konstrukte scheinen keinen Einfluß auf sich differenzierende C2C12-Zellen zu haben, können aber die Morphologie undifferenzierter Zellen verändern. Mit Alk^{FL} (A – C, G – L) bzw. Alk^{EC} (D – F, M – O) transfizierte C2C12 (A – I) bzw. C3H10T1/2-Zellen (J – O) wurden 6 Tage in GM (G – I) bzw. DM (A – F, J – O) kultiviert, fixiert und einer Antikörperfärbung gegen Mhc (grün in A, C, D, F, G, I, J, L, M und O) bzw. Alk (rot in B, C, E, F, H, I, K, L, N und O) unterzogen. A - F Die Expression der aktivierten Form von Alk (Alk^{FL}) bzw. einer dominant-negativen Form von Alk (Alk^{EC}) (rot in B, C, E, F) hat keinen Einfluß auf die Ausbildung mehrkerniger Myotuben die weiterhin Mhc exprimieren. G – L Hingegen führt die Expression von Alk^{FL} (rot in H, I, K, L) in undifferenzierten C2C12 oder C3H10T1/2-Zellen zur Änderung der Morphologie der Zellen und eine Mhc-Expression kann nicht nachgewiesen werden. M - O Außerdem führt die Expression einer dominant negativen Form von Alk (Alk^{EC}) dazu, daß ein Teil der C3H10T1/2-Zellen beginnt Mhc zu exprimieren.

III.b Analyse der Mutanten der 2. und 3. Gruppe

5.18 Das viszerale Mesoderm der Mutanten V3, V6 und V8 umschließt nicht den Mitteldarm

Die Mutanten der Gruppen zwei und drei tragen eine letale Mutation auf dem 3. Chromosom. Alle Allele wurden in Komplementationstest gegen Mutanten getestet, bei denen ebenfalls ein Fehlen des viszeralen Mesoderms beschrieben wurde (siehe Abschnitt 5.20).

Die zweite Gruppe zeichnete sich dadurch aus, daß zwar ein durchgehendes Band des viszeralen Mesoderms gebildet wird, sich dieses Band aber nicht nach dorsal und ventral ausbreitet. Dadurch wird der Mitteldarm nicht umschlossen und der Dotter kann entweichen. Dieser Phänotyp ist unterschiedlich stark ausgeprägt.

Die Mutante V3 bildet fast immer ein durchgehendes Band des viszeralen Mesoderms (Abb. 5.25 D-H, J), nur gelegentlich sind Lücken festzustellen (Abb. 5.25 I). Dieses Band ist im Stadium 12, nach dem Einsetzen der Fusionen im viszeralen Mesoderm, sehr schmal und die Zellen zeigen nicht die gestreckte Morphologie, die charakteristisch für dieses Stadium ist. Sie erscheinen weiterhin abgerundet und alle Zellen scheinen nur einen Zellkern aufzuweisen, der zudem *rP298-lacZ* positiv ist (Abb. 5.25 D-G). Das Band ist insgesamt dünner, als es im Wildtyp vor dem Einsetzen der Fusionen ist, und es sind auch keine Zellen zu erkennen, die die Morphologie von FCM's aufweisen. Dies legt die Vermutung nahe, daß das viszerale Mesoderm in dieser Mutante ausschließlich aus Founderzellen besteht und die FCM's nicht gebildet werden. Normalerweise sind die Founderzellen in der Lage, auch ohne das Stattfinden von Fusionen, die Mitteldarmmuskulatur korrekt auszubilden. In der Mutante V3 ist dies aber nicht der Fall. Das viszerale Mesoderm bildet auch in späten Stadien nur ein schmales Band (Abb. 5.25 J).

Der Phänotyp der Mutanten V6 und V8 ist schwächer als der der Mutante V3. Zwar wandert auch hier das viszerale Mesoderm nicht korrekt nach dorsal und ventral, aber die Zellen ändern ihre Morphologie und beginnen sich ab dem Stadium 12 langsam zu strecken (Abb. 5.25 K-M, gezeigt ist nur V6). Es ist daher möglich, daß diese Defekte auf sekundären Effekten beruhen. Diese Defekte könnten darin bestehen, daß z.B. das Endoderm nicht richtig ausgebildet wird und daher den Zellen des viszeralen Mesoderms die Grundlage fehlt, um sich korrekt über dem Mitteldarm zu verteilen. Es ist aber auch möglich, daß den viszeralen Zellen selbst die entscheidenden Faktoren zum Umschließen des Mitteldarms fehlen.

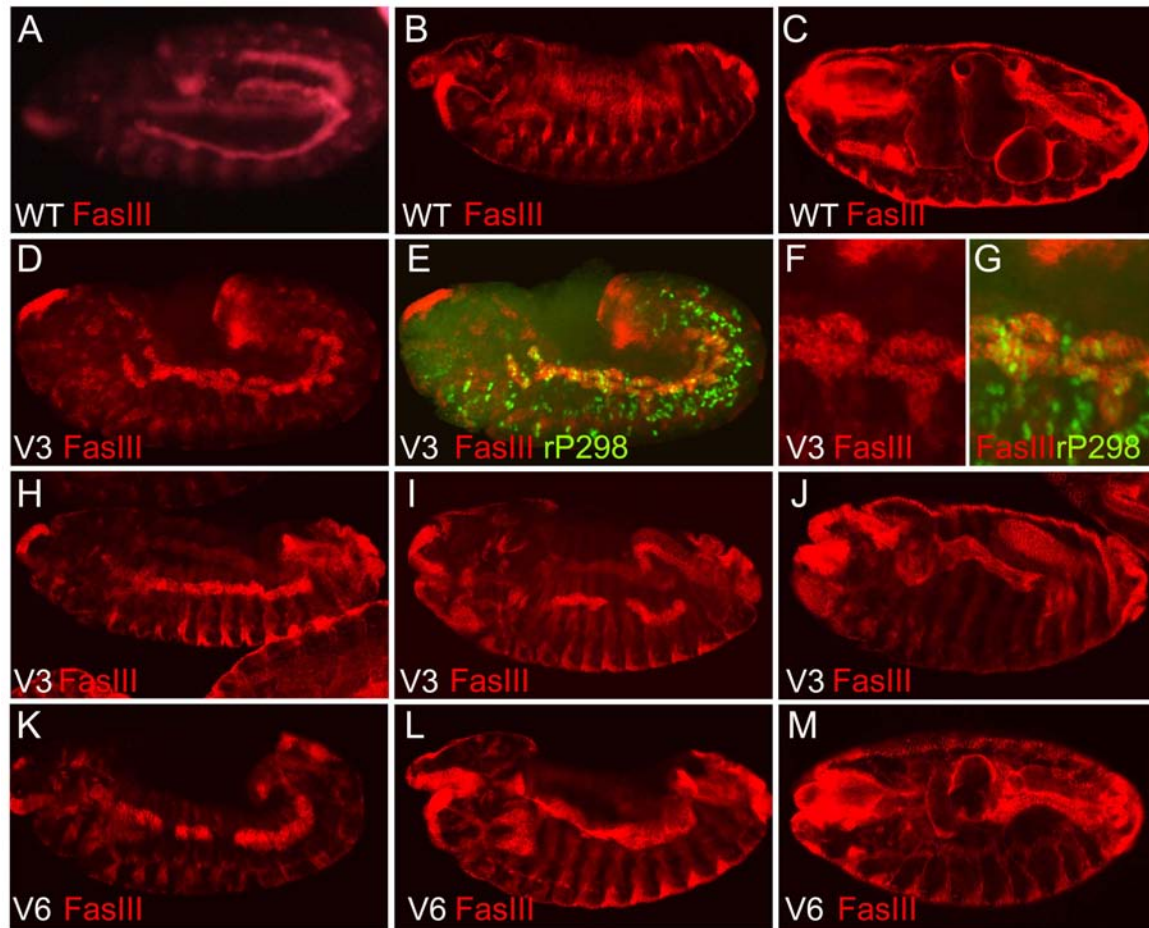


Abb. 5.25: Das viszerale Mesoderm der Mutanten V3 und V6 breitet sich nicht über den Mitteldarm aus. Das viszerale Mesoderm wurde durch FasIII markiert (rot in A-M). Founderzellen wurden durch *rP298-lacZ* markiert (grün in E, G). A-C Das viszerale Mesoderm in Wildtyp-Embryonen besteht im Stadium 11 aus einem kontinuierlichen Band aus Founderzellen und FCM's (A). Dieses breitet sich nach den Fusionen langsam über den Mitteldarm aus (B, Stadium 14), umschließt schließlich den gesamten Mitteldarm und bildet die Darmkonstriktionen (C Stadium 17). D-J in V3 mutanten Embryonen wird das Band der viszeralen Zellen gebildet (Stadium 12 D-G) aber es breitet sich nicht über den Mitteldarm aus (H, Stadium 14; J, Stadium 16). Teilweise sind auch Lücken im Band des viszeralen Mesoderms zu erkennen (I, Stadium 14). Außerdem strecken sich die Zellen im Stadium 12 nicht richtig, sondern bleiben rund (F, G). In diesem Stadium exprimieren alle viszeralen Zellen den Founderzellmarker *rP298-lacZ* (E, G). K-M In V6 mutanten Embryonen sind teilweise Lücken im Band des viszeralen Mesoderms zu erkennen (K, Stadium 13). Auch hier erstreckt sich das viszerale Mesoderm nicht über den Mitteldarm (L, Stadium 14; M Stadium 17).

5.19 Den Mutanten V4, V5 und V7 fehlt das viszerale Mesoderm

Die dritte Gruppe der Mutanten ist durch das Fehlen des viszeralen Mesoderms in FasIII-Antikörperfärbungen charakterisiert. Auch die Mutanten dieser Gruppe zeichnen sich durch Unterschiede in der Stärke des Phänotyps aus.

In der Mutante V5 sind in FasIII-Antikörperfärbungen im Stadium 11 noch Fragmente des viszeralen Mesoderms zu erkennen (Pfeil in Abb. 5.26 D). Diese sind aber kurz darauf nicht mehr zu detektieren und ab diesem Zeitpunkt ist keine FasIII-Expression in den Zellen des viszeralen Mesoderms zu erkennen (Abb. 5.26 E). Folgt man dem Schicksal der viszeralen Zellen mit dem Marker *bap-lacZ* so zeigt sich, daß im somatischen Mesoderm β -Galaktosidase positive Zellen vorhanden sind, die an der Bildung des somatischen Mesoderms teilnehmen (Abb. 5.26 F). Im Wildtyp ist das somatische Mesoderm β -Galaktosidase frei (Abb. 5.26 C).

Bei der Mutante V4 sind in frühen Stadien keine FasIII positiven Zellen vorhanden (Abb. 5.26 G) und dementsprechend ist auch kein funktionelles viszerales Mesoderm in den späteren Stadien zu erkennen (Abb. 5.26 H). Kreuzt man in diese Mutante *bap-lacZ* als Marker für die viszeralen Zellen, so kann man auch hier markierte Zellen im somatischen Mesoderm detektieren (Abb. 5.26 I). Die Zellen des viszeralen Mesoderms exprimieren daher auch in dieser Mutante *bap-lacZ* als Marker für das viszerale Mesoderm, obwohl die Zellen in FasIII-Antikörperfärbungen kaum zu erkennen sind.

Auch in der Mutante V7 fehlt das viszerale Mesoderm in frühen und späten Stadien (Abb. 5.26 J, K). Im Gegensatz zur Mutante V4 und V5 wird es aber nicht als solches determiniert, denn zu keinem Zeitpunkt sind in diesen Mutanten *bap-lacZ* markierte Zellen zu detektieren (Abb. 5.26 L).

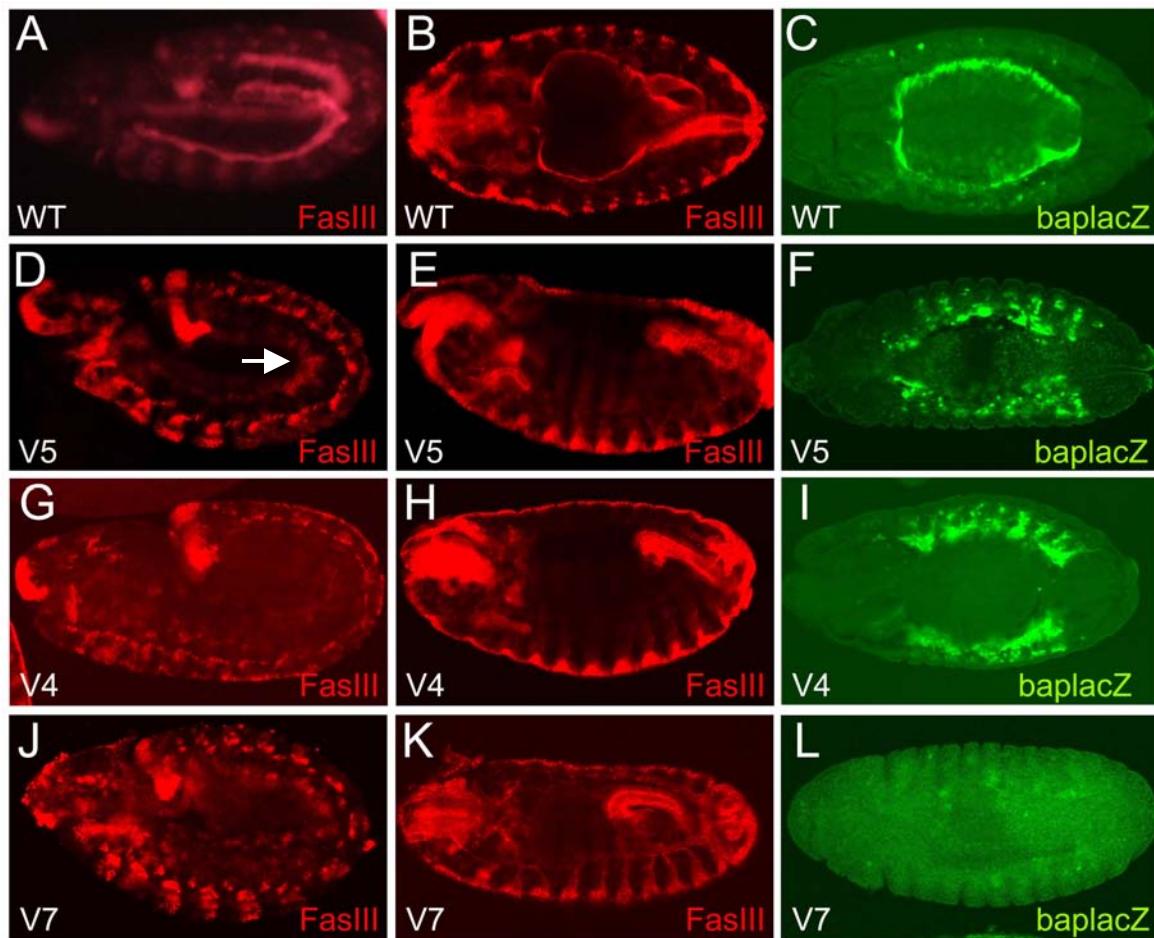


Abb. 5.26: Das viszerale Mesoderm fehlt in den Mutanten V4, V5 und V7. Das viszerale Mesoderm wurde mit FasIII (rot in A, B, D, E, G, H, J und K) dargestellt, das Schicksal der visceralen Zellen mit *bap-lacZ* verfolgt (grün in C, F, I und L). A - C In Wildtyp-Embryonen ist im Stadium 11 (A) ein durchgehendes Band von visceralen Zellen zu erkennen. Dieses breitet sich über den gesamten Mitteldarm aus (B, Stadium 14, ventrale Ansicht). Im Wildtyp sind die *bap-lacZ* positiven Zellen bis auf wenige Ausnahmen nur in der visceralen Muskulatur zu erkennen (C, Stadium 14, ventrale Ansicht). D - F In V5 mutanten Embryonen sind im Stadium 11 Reste des visceralen Mesoderms zu erkennen (Pfeil in D). Diese sind im Stadium 14 (E) nicht mehr vorhanden. Es können aber *bap-lacZ* positive Zellen im somatischen Mesoderm detektiert werden (F, Stadium 14, ventrale Ansicht). G - I In V4 mutanten Embryonen ist zu keinem Zeitpunkt viszerale Mesoderm in FasIII Färbungen zu erkennen (G, Stadium 11; H, Stadium 14). Aber auch hier können *bap-lacZ* positive Zellen im somatischen Mesoderm beobachtet werden (I, Stadium 14, ventrale Ansicht). J - L Auch in den V7 mutanten Embryonen ist kein viszerale Mesoderm erkennbar (J, Stadium 11; K, Stadium 14). In diesen Mutanten sind keine *bap-lacZ* positiven Zellen in der somatischen Muskulatur vorhanden (L, Stadium 14, ventrale Ansicht).

5.19.1 V5 zeigt neben dem viszeralem Phänotyp schwache Defekte im somatischen Mesoderm

Die Mutation V5 ist durch ihren Phänotyp, bei dem zunächst das viszerale Mesoderm gebildet wird, dann aber die weitere Entwicklung des Gewebes nicht wildtypisch verläuft und die viszerale Zellen an der Ausbildung der somatischen Muskulatur beteiligt werden, besonders interessant. Daher wurde diese mutante Linie einer weitergehenden phänotypischen Analyse unterzogen.

Durch die Anfertigung von Kutikula-Präparaten konnte gezeigt werden, daß die Mutation V5 keine Auswirkungen auf die korrekte Ausbildung der Segmente hat. Es sind zwar leichte Störungen zu beobachten, aber das grundlegende Muster der Kutikulazähne ist wildtypisch (Abb. 5.27 B). Betrachtet man das somatische Mesoderm, so ist zu erkennen, daß die *rP298-lacZ* exprimierenden Founderzellen vorhanden sind (Abb. 5.27 D). In einer β -Tubulin-Färbung zeigten sich aber deutliche Musterdefekte. Die Muskeln erscheinen kürzer und gedrungener, aber ihre Orientierung und Anheftung entspricht dem Wildtyp (Abb. 5.27 F).

Schließlich wurde untersucht, ob der zweite viszerale Muskeltyp, die longitudinale viszerale Muskulatur, korrekt determiniert wird. Diese Muskulatur hat ihren Ursprung am posterioren Pol des Embryos und entsteht somit unabhängig von der zirkulären viszerale Muskulatur. Die Zellen der longitudinalen viszerale Muskulatur benötigen die zirkuläre viszerale Muskulatur als Substrat für ihre Wanderung nach anterior (Georgias et al., 1997; Kusch und Reuter, 1999). Während dieser Wanderung fusionieren die Founderzellen der longitudinalen viszerale Muskulatur mit den FCM's, die zusammen mit der zirkulären viszerale Muskulatur aus dem Rumpfmesoderm entstanden sind (Klapper et al., 2001; Klapper et al., 2002). In V5 mutanten Embryonen, die *croc-lacZ* als Marker für die longitudinale Muskulatur tragen, werden die Anlagen der longitudinalen viszerale Muskulatur korrekt determiniert und wanderten zunächst nach anterior (Abb. 5.27 H). Sie erreichen aber nicht wie im Wildtyp im Stadium 14 den anterioren Bereich des Mitteldarms und streckten sich auch nicht nach dorsal und ventral. Außerdem scheint die Zahl der *croc-lacZ* positiven Zellen in diesem späteren Stadium stark reduziert zu sein (Abb. 5.27 J). Diese Ergebnisse zeigen, daß die korrekte Ausbildung der longitudinalen viszerale Muskulatur in den Mutanten trotz korrekter Determination nicht erfolgt.

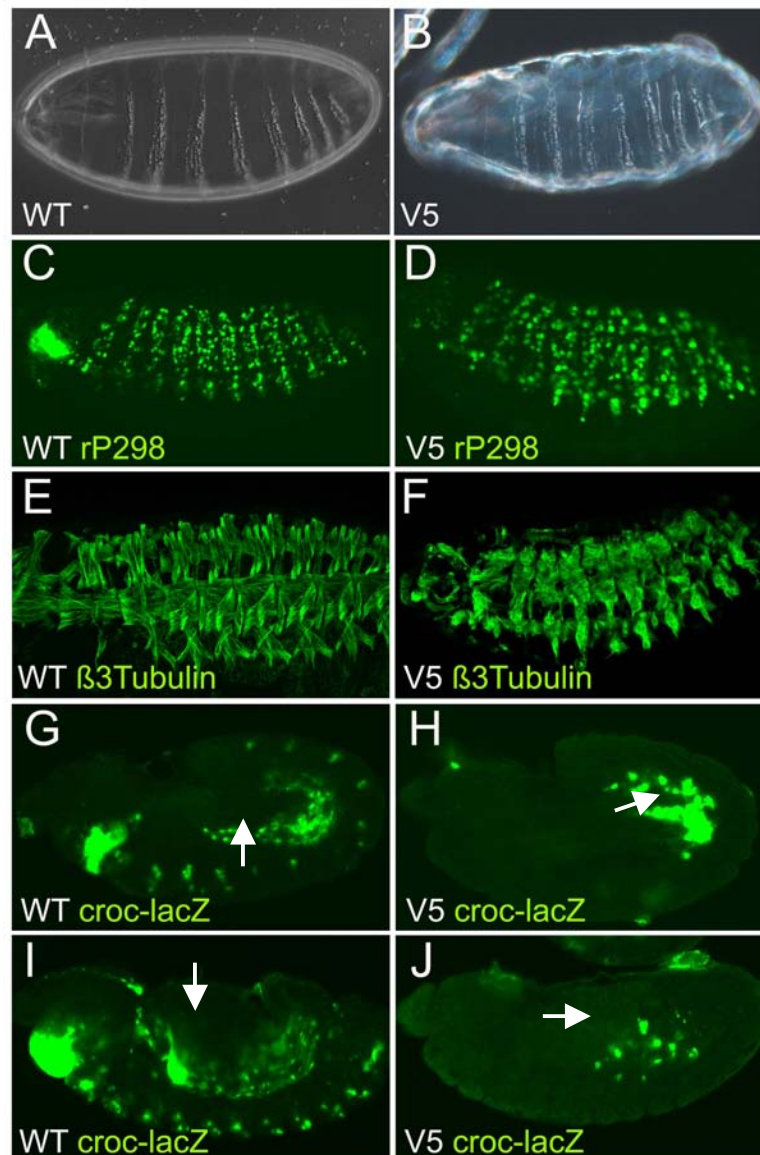


Abb. 5.27: Die Mutante V5 zeigt Defekte im somatischen Mesoderm und in der longitudinalen viszerale Muskulatur. Gezeigt sind Wildtyp-Embryonen (A, C, E, G und I) bzw. V5 mutante Embryonen (B, D, F, H und J). Zur Detektion von Segmentierungsstörungen wurden Kutikulapräparate angefertigt (A, B). Die Founderzellen sind mit *rP298-lacZ* (grün in C, D), die somatische Muskulatur mit $\beta 3$ -Tubulin-Antikörpern (grün in E, F) und die longitudinale viszerale Muskulatur mit *croc-lacZ* (grün in G-J) markiert. A-B In Kutikulapräparaten zeigen die V5 mutanten Embryonen leichte Defekte. Das allgemeine Muster der Kutikulazähnnchen ist aber wie im Wildtyp. C-D Die Founderzellen der somatischen Muskulatur werden in den Mutanten normal determiniert. E-F Allerdings zeigen sich in Stadium 16 mutanten Embryonen später leichte Musterdefekte. G-J Auch die Anlagen der longitudinalen viszerale Muskulatur werden in den mutanten Embryonen im Stadium 11 (Pfeil in G, H) normal determiniert. Die Zellen wandern aber nicht normal nach anterior und scheinen im Stadium 14 (Pfeil in I, J) in den Mutanten reduziert zu sein.

5.20 Genetische Analyse der Mutanten

Die oben beschriebenen 6 Mutationen auf dem 3. Chromosom wurden einer genetischen Analyse unterzogen, um herauszufinden, ob sie neue Allele von schon bekannten Genen darstellen oder, wenn dies nicht der Fall ist, um die Lokalisation der Mutation auf dem 3. Chromosom genauer zu bestimmen.

Zu diesem Zweck wurden die 6 Allele zunächst untereinander gekreuzt, um zu bestimmen, ob einige von ihnen in die selbe Komplementationsgruppe fallen. Hierbei zeigte sich, daß in der Tat V6 und V8, welche auch den selben Phänotyp zeigen, zueinander allelisch sind. Alle anderen Allele bilden eigene Komplementationsgruppen. Des weiteren wurden die Mutanten gegen Allele von Genen getestet, die auf dem 3. Chromosom liegen und deren Funktion in der viszeralen Muskulatur schon beschrieben wurde. Folgende Allele wurden getestet: *bap*^{Df} (Zaffran et al., 2001), *biniou*^{II} (BL 1438), *lame duck*^I (Duan et al., 2001) und *punt*¹⁰⁴⁶⁰ (BL 11745).

Dabei zeigte sich, daß V4 allelisch zur Defizienz von *bagpipe* (*bap*^{Df}) ist. Da *tinman* (*tin*) und *bagpipe* (*bap*) sehr nah im Genom beieinander liegen, wurde diese Defizienz dadurch erhalten, daß die Defizienz *Df(3R)e^{F1}* mit der Defizienz *Df(3R)e^{D7}*, die gleichzeitig ein *tin* Rettungskonstrukt trägt, gekreuzt wurde. Hierdurch wird der Phänotyp von *tin* gerettet (Zaffran et al., 2001). Da auch der Phänotyp von V4 (völliger Verlust der viszeralen Muskulatur) mit dem bei *bap* mutanten Embryonen beobachteten Phänotyp (Azpiazu und Frasch, 1993) übereinstimmt, stellt V4 vermutlich eine neue *bap* Mutante dar.

Alle anderen Mutanten sind nicht allelisch zu den getesteten Genen. Daher wurden diese Gene einer weiteren Analyse unterzogen, indem sie mit einer Kollektion von Fliegen gekreuzt wurden, die an unterschiedlichen Stellen des 3. Chromosoms Defizienzen aufweisen (DK3; *Bloomington Drosophila Stock Center*; siehe auch Anhang 9.2). Sowohl die letalen mutanten Allele als auch die Defizienzen sind nur über einem Balancer oder einem Chromosom, welches im Bereich der Deletion wildtypisch ist, vital. Daher konnte mit Hilfe der Defizienzen, deren Bruchpunkte bekannt sind, die Lokalisation der letalen Mutationen eingegrenzt werden. Wurden in den Nachkommen einer Kreuzung Fliegen detektiert, die keinen auf den Balancer Chromosomen lokalisierten Marker tragen, so liegen die letale Mutation und die Defizienz nicht im selben Bereich des Chromosoms. Das defiziente und das EMS mutagenisierte Chromosom konnten sich in diesem Fall komplementieren, so daß beide Chromosomen zusammen vital sind und sich die Nachkommen bis zur adulten Fliege entwickeln (Abb. 5.28 A). Wenn keine adulten Tiere in den Nachkommen entdeckt werden,

die keinen der beiden Marker von den Balancerchromosomen tragen, liegt die letale Mutation und die Defizienz im selben Bereich (Abb. 5.28 B).

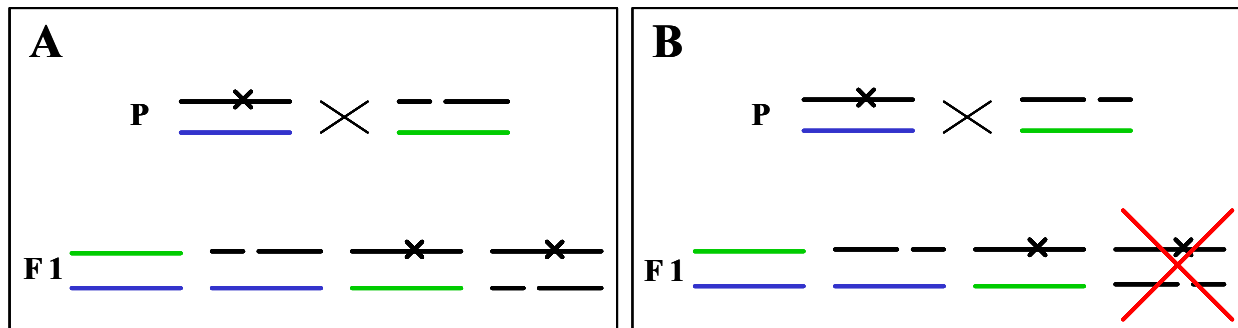


Abb. 5.28: Kreuzungsschema zur Lokalisation der Mutationen mit Hilfe des DK3. Markierte Balancerchromosomen sind farbig gekennzeichnet (grün bzw. blau), die embryonal letale Mutation durch ein Kreuz und die Defizienz durch eine Lücke dargestellt. **A** Wenn die Mutation und die Defizienz nicht zueinander allelisch sind, erhält man in den Nachkommen der Kreuzung u.a. Fliegen, die keines der beiden Balancerchromosomen tragen. **B** Liegen die Defizienz und die Mutation im selben Bereich des Chromosoms, so können sie sich nicht gegenseitig komplementieren und die Embryonen, die sowohl das defiziente als auch das mutante Chromosom tragen, sterben. Es werden daher keine Fliegen beobachtet die keinen der beiden Marker der Balancerchromosomen tragen (rotes Kreuz).

Für alle Allele, bis auf die Mutante V7, wurden mehrere Bereiche detektiert, die zu den einzelnen Mutanten allelisch sind. Dies zeigt, daß durch die EMS-Mutagenese mehrere unabhängige letale Mutationen auf den einzelnen Chromosomen induziert wurden. Um zu bestimmen, welche dieser letalen Mutationen für den viszeralen Phänotyp verantwortlich ist, müssen transheterozygote Embryonen, das heißt Embryonen die aus einer Kreuzung zwischen den defizienten Fliegen und dem jeweiligen Mutanten Allel hervorgehen, untersucht werden. Wenn diese Embryonen den selben Phänotyp wie die Allele aufweisen, kann davon ausgegangen werden, daß die letale Mutation im Bereich dieser Defizienz für den viszeralen Phänotyp verantwortlich ist. Da die Defizienzen in der Fliegenkollektion aber nur ca. 80% des 3. Chromosoms abdecken, kann es auch sein, daß keine der detektierten letalen Mutationen für den viszeralen Phänotyp verantwortlich ist. Diese Untersuchungen müssen im Folgenden an den mutanten Allelen durchgeführt werden. Die jeweiligen Bereiche die allelisch zu den einzelnen Mutanten sind, können der nachfolgenden Tabelle entnommen werden.

EMS ALLEL	DEFIZIENZ	LOKALISATION
V3	BL 997	067A02;067D07-13 or 067A05;067D09-13
	BL 1910	097A;098A01-02
	BL 1990	083C01-02;084B01-02, 083D04-05;084A04-05;098F01-02
	BL 2393	083E01-02;084A04-05
	BL 4370	079E05;079F02-06
	BL 4431	089E01-F04;091B01-B02
	BL 4500	066E01-06;066F01-06
	BL 6471	067E03-07;068A02-06
	BL 6551	071C02-03;072B01-C01
V5	BL 1962	085A02;085C01-02
	BL 2612	068C08-11;069B04-05
	BL 3071	089E03-04;090A01-07, 089E01-02;090A
	BL 4370	079E05;079F02-06
V6	BL 1534	087D01-02;088E05-06
	BL 3124	070C01-02;070D04-05, 066E
	BL 3649	063C02;063F07
V7	BL 3547	099B05-06;099E04-F01,098F;100F

6. Diskussion

6.1 Analyse der *sns*-Promotorregion

Die Analyse der Promotorregion von *sticks and stones* (*sns*) zeigte, daß der Bereich von 2,5 kb vor dem Transkriptionsstart ausreichend ist, um die spezifische Expression eines Gens in den fusionskompetenten Myoblasten (FCM's) sowohl des viszeralen als auch des somatischen Mesoderms zu bewirken. Das Expressionsmusters der β -Galaktosidase in den transgenen Fliegenlinien ist identisch zu der beschriebenen Expression des Sns-Proteins im Wildtyp (Bour et al., 2000). Daher ist anzunehmen, daß der Promotorbereich nur in den FCM's aktiviert wird. Doppelfärbungen, um dies in den Stadien vor der Fusion zu belegen, schlugen aber bislang fehl. Da nach den Fusionen die Expression im gesamten Synzytium vorhanden ist, kann in späteren Stadien keine Aussage über eine zusätzliche Expression z.B. in den Founderzellen gemacht werden. Um allerdings auszuschließen, daß die Expression in diesen Zelltypen bewirkt wird, sollten die etablierten *sns2,5-lacZ* oder *sns4,5-lacZ* Fliegenlinien in einen mutanten Hintergrund gekreuzt werden, in dem keine Fusionen in der Muskulatur stattfinden, wie z.B. *myoblast city*, (*mbc*; Erickson et al., 1997; Nolan et al., 1998). Wenn dann die in den in *mbc* Mutanten entstehenden „Minimuskeln“ keine β -Galaktosidase-Expression aufweisen, kann davon ausgegangen werden, daß tatsächlich die Expression nur in den FCM's bewirkt wird.

Innerhalb des 2,5 kb Bereiches, der als ausreichend für die Expression bestimmt wurde, liegt eine putative Bindestelle für den Transkriptionsfaktor Mef2. Mef2 wird für die Entwicklung des somatischen und viszeralen Mesoderms sowie des Herzens benötigt (Lily et al., 1994, 1995; Nguyen et al., 1994; Bour et al., 1995; Taylor et al., 1995). Ebenso sind hier vier putative Bindestellen für Biniou, sowie eine putative Bindestelle für die beiden

Transkriptionsfaktoren Tinman und Bagpipe vorhanden. Tinman wird für die Spezifizierung des viszerale Mesoderms und des Herzens benötigt, während Bagpipe ebenso wie Biniou, essentiell für die Ausbildung des viszerale Mesoderms ist (Azpiazu und Frasch, 1993; Zaffran et al., 2001).

Da die Promotorkonstrukte in dieser Arbeit weniger für die Analyse der für die Regulation der Transkription verantwortlichen Faktoren, sondern in erster Linie mit dem Ziel der Bestimmung eines Promotorbereiches etabliert wurden, welcher die Expression in den FCM's bewirkt, beinhaltete das Konstrukt *psns2,5-lacZ* Bindestellen für alle drei Transkriptionsfaktoren. Dennoch lassen sich aus den Ergebnissen einige Rückschlüsse auf die, für die *sns* Expression benötigten Faktoren ziehen. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß der distale Promotorbereich (*sns2,0 kb*) mit einer Mef2- und acht Biniou-Bindestellen nicht essentiell ist, um die Expression von *sns* in den FCM's des Embryos zu bewirken. In diesem Bereich befindet sich wahrscheinlich lediglich ein nicht näher bestimmtes Enhancerelement, welches die Expression in den FCM's verstärkt. Ebenso scheint hier ein Promotorelement für die Expression im Gonadenmesoderm zu sein, welches aber wahrscheinlich zum regulatorischen Bereich des stromaufwärts von *sns* gelegenen CG8746 gehört, da *sns* normalerweise nicht im Gonadenmesoderm exprimiert wird. Auch die Mef2-Bindestelle, die im 5'UTR von *sns* postuliert wurde, scheint nicht essentiell für die Expression von *sns* zu sein. Da Bour et al., (2000) gezeigt haben, daß Mef2 nicht für die Expression von *sns* benötigt wird, ist voraussichtlich auch die dritte postulierte Mef2-Bindestelle, welche 2,3 kb vor dem Transkriptionsstart von *sns* liegt, nicht für die Expression notwendig.

Es erscheint wahrscheinlich, daß *sns* in den beiden Populationen der FCM's unterschiedlich reguliert wird, da z.B. in *lame duck/myoblast incompetent/glee* (*lmd/minc/glee*) mutanten Embryonen keine *sns* Expression in den FCM's des somatischen Mesoderms detektiert werden kann, während sie in den FCM's des viszerale Mesoderms vorhanden ist (Ruiz-Gómez et al., 2002). In den FCM's des viszerale Mesoderms könnte die Expression von *sns* durch die hier spezifisch exprimierten Transkriptionsfaktoren Bagpipe/Tinman hervorgerufen werden. Um Hinweise auf die für die Expression in den somatischen und viszerale FCM's essentiellen Promotorbereiche zu bekommen, könnte dieser sukzessive verkürzt werden und die β -Galaktosidase-Expression analysiert werden. Des weiteren könnten die Promotorkonstrukte in Fliegenlinien gekreuzt werden, die eine Mutation für *bap* aufweisen und wiederum analysiert werden, ob sich das Expressionsmuster durch den Verlust dieses Faktors ändert.

Die für den Transkriptionsfaktor Biniou postulierte Bindesequenz (Zaffran et al., 2001, siehe auch Anhang) umfaßt nur wenige Basen und konnte daher häufig im Promotorbereich von *sns*, wie auch in anderen genomischen Bereichen detektiert werden. Ob diese Bindestellen essentiell für die Expression sind, müßte wiederum durch Verkürzung der Promotorkonstrukte oder durch Einkreuzen von *sns2,5-lacZ* in den mutanten Hintergrund untersucht werden.

Schließlich könnten auch noch andere Faktoren oder Sequenzbereiche, die durch die Sequenzanalyse der putativen Promotorregion von *sns* nicht identifiziert wurden, essentiell für die Regulation der Transkription sein. So könnten z.B. Enhancer-Elemente in den Intronbereichen des Gens lokalisiert sein, die in den in dieser Arbeit angefertigten Konstrukten nicht untersucht wurden. Hinz et al., (1992) haben gezeigt, dass dies auch bei der Regulation des $\beta 3$ -*tubulin* Gens der Fall ist. Auch bei der Analyse anderer Gene, wie z.B. *Drosophila hand*, hat sich gezeigt, daß die regulatorischen Elemente nicht im 5' Bereich, sondern in den Intronbereichen des Gens lokalisiert sind (A. Paululat, persönliche Mitteilung). Der niedrige Expressionslevel der Promotorkonstrukte, der auch bei dem *sns4,5-lacZ* Promotorkonstrukt nur mit Hilfe einer Verstärkung durch das TSA-Fluorescein-System detektiert werden konnte, könnte ebenfalls aufgrund fehlender Enhancer-Elemente zu erklären sein, da 453 bp des 5'UTR von *sns* nicht in den Konstrukten enthalten sind.

Überraschend war auch der Befund, daß in dem Promotorbereich von *sns* keine Bindestelle für den Transkriptionsfaktor Lmd/Minc/Glee identifiziert werden konnte. In *lmd/minc/glee* mutanten Embryonen stoppen die FCM's des somatischen Mesoderms in ihrer Differenzierung und exprimieren kein *sns* (Duan et al., 2001; Ruiz-Gómez et al., 2002). Die Abwesenheit von Lmd/Minc/Glee Bindestellen kann unterschiedliche Ursachen haben. Zum einen ist es möglich, daß, wie oben erwähnt, Bereiche außerhalb der untersuchten 4,5 kb des putativen Promotorbereichs einen Einfluß auf die Expression von *sns* haben und Bindestellen für Lmd/Minc/Glee enthalten. Eine andere Möglichkeit besteht darin, daß nicht nur die von Duan et al., (2001) experimentell bestimmte Sequenz als Bindestelle dient, sondern daß auch andere Sequenzen, mit eventuell leichten Abweichungen, eine Rolle spielen. Schließlich könnte die Expression von *sns* nicht direkt von Lmd/Minc/Glee, sondern über andere Faktoren reguliert werden. Lmd/Minc/Glee wurde zwar als direkter Regulator von *mef2* identifiziert (Duan et al., 2001), da aber Mef2 für die Expression von *sns* nicht benötigt wird (Bour et al., 2000), scheidet eine Genkaskade von Lmd über Mef2 zu Sns als Regulationsweg aus.

6.1.1 *sns4,5-GAL4* kann als *GAL4*-Treiberlinie für die zeit- und gewebespezifische Expression in den FCM's eingesetzt werden

Zur Etablierung der *GAL4*-Treiberlinie für die ektopische Expression in den FCM's wurde der gesamte putative Promotorbereich von *sns* eingesetzt (*sns4,5 kb*, siehe auch Abb. 5.3 und Abb. 5.6), da dieser Bereich eine stärkere Expression des Reportergens *lacZ* bewirkte, als das kürzere, 2,5 kb umfassende Fragment (*sns2,5 kb*, siehe auch Abb. 5.3 und Abb. 5.6). Das *sns4,5-GAL4*-Konstrukt zeigt, wenn es mit *UAS-lacZ* kombiniert wird, erst weit nach dem Ende der Fusionen im Stadium 16 eine Expression von β -Galaktosidase in allen Zellen des viszeralen und somatischen Mesoderms. Im Stadium 11, zu dem Zeitpunkt an dem die Expression in den *lacZ*-Konstrukten in allen FCM's detektiert werden kann, ist sie hier nur in einigen wenigen Zellen vorhanden.

Es konnte gezeigt werden, daß die zeitliche Verzögerung der Expression der β -Galaktosidase nicht auf transkriptioneller Ebene verursacht wird, da die *lacZ*-RNA ab dem Stadium 11 in allen FCM's detektiert werden konnte. Die, erst im späten Stadium 16 beobachtete, Expression der β -Galaktosidase scheint daher vielmehr auf einer Repression der Translation im Stadium 11 zu beruhen. Eine solche Translationsrepression ist mehrfach in der Entwicklung unterschiedlicher Organismen und Geweben beschrieben worden. Die Mechanismen hierfür können unterschiedlich sein und sowohl die Initiation, als auch die Elongation und Termination der Translation betreffen. Meist wird sie durch die Interaktion von RNA-bindenden Proteinen mit den 5' oder 3' untranslatierten Regionen der mRNA vermittelt (Übersichtsartikel: Macdonald, 2001; Kuersten und Goodwin, 2003). Da diese für jedes Gen spezifisch sind, ist es unwahrscheinlich, daß die translationale Repression auch bei der ektopischen Expression anderer Genprodukte hervorgerufen wird. Um dies zu überprüfen könnten die *sns4,5-GAL4*-Fliegen mit *UAS-GFP* Fliegen gekreuzt werden. Der Nachweis dieses Reportergens sollte in den Nachkommen der Kreuzung schon in frühen Stadien möglich sein. Das *sns4,5-GAL4*-Konstrukt kann dann als Treiberlinie für die FCM's des somatischen und viszeralen Mesoderms verwendet werden.

Allerdings muß bei der Verwendung der *sns4,5-GAL4*-Treiberlinie beachtet werden, daß neben der *sns* spezifischen Expression in den FCM's, eine zusätzliche Expressionsdomäne im Gonadenmesoderm vorhanden ist. Wenn diese zusätzliche Expression ausgeschlossen werden muß, sollte das *sns2,5 kb* Fragment für die Etablierung einer *GAL4*-Treiberlinie eingesetzt werden. Hier ist aber zu beachten, daß der Expressionslevel dieses Konstruktes deutlich niedriger ist.

6.2 *lethal of scute* scheint für die Determination eines Teils der Founderzellen im viszeralem Mesoderm essentiell zu sein

Lethal of scute (*L^{sc}*) wird im somatischen Mesoderm in den Zellgruppen exprimiert, aus denen durch den Prozeß der lateralen Inhibition eine Zelle selektiert wird, in welcher die Expression fortgeführt wird und die sich später zu einer Founderzelle ausbildet. Fehlt Lethal of scute, so werden die Founderzellen nicht determiniert (Carmena et al., 1995). Um mögliche Analogien zwischen der somatischen und viszeralem Muskulatur in diesem Prozeß zu detektieren, wurde die Beteiligung dieses Faktors an der Entwicklung des viszeralem Mesoderms untersucht.

Die in dieser Arbeit durchgeführte Analyse der *achaete-scute* defizienten Embryonen, sowie der Embryonen in denen ein *lethal of scute* RNAi-Konstrukt (RNAi-*l^{sc}*) im viszeralem Mesoderm exprimiert wurde, zeigte deutliche Lücken im Band der Founderzellen des viszeralem Mesoderms. Dies stimmt gut mit dem von Carmena et al. (1995) im somatischen Mesoderm beobachteten Phänotyp überein, wo auch ein Teil der Founderzellen in den Mutanten nicht determiniert wird, während die Determination der übrigen Founderzellen normal verläuft. Ebenso konnten bei der Determination der Neuroblasten von *Drosophila* Embryonen mehrere Arbeitsgruppen beobachten, daß die unterschiedlichen Defizienzen und Mutationen im *achaete-scute* Komplex die Expression von Lethal of scute in jeweils nur einem Teil der Neuroblasten beeinflussen. Die Expression in den anderen Neuroblasten-Klustern bleibt unverändert. Es wird angenommen, daß andere Proneuralgene die Funktion von *L^{sc}* übernehmen können und so ein Teil der Founderzellen und Neuroblasten auch beim Verlust von *L^{sc}* normal determiniert werden. Dies wird wahrscheinlich durch ein komplexes regulatorisches System hervorgerufen, von dem angenommen wird, daß es sich über ca. 90 kb des *achaete-scute* Komplexes erstreckt (Cabrera, 1990; Martín-Bermudo et al., 1991; Martín-Bermudo et al., 1993).

Die in dieser Arbeit durchgeführten Überexpressionsexperimente von *UAS-l^{sc}*, bei denen alle Zellen des viszeralem Mesoderms in Founderzellen verwandelt werden, deuten ebenfalls auf einen Einfluß von *l^{sc}* im Determinationsprozeß hin. Allerdings muß hierbei beachtet werden, daß eine Überexpression von *l^{sc}* in den Anlagen des Scutellums dort zusätzliche Borsten induzieren kann, obwohl *l^{sc}* normalerweise nicht für die Entwicklung dieser externen Sinnesorgane in diesem Gewebe benötigt wird (Röttgen et al., 1998). Der Überexpressionseffekt im viszeralem Mesoderm könnte also auch auf nicht endogenen Effekten beruhen.

Es konnte keine endogene Expression von *lethal of scute* im viszeralem Mesoderm, weder auf Proteinebene noch als RNA, nachgewiesen werden. Dies ist aber wahrscheinlich auf generelle Probleme beim Nachweis von *l'sc* zurückzuführen, da eine Detektion auch in anderen Geweben fehl schlug, in denen eine Expression von Lethal of scute schon nachgewiesen wurde (somatisches Mesoderm, Carmena et al., 1995; Neuroektoderm, Martín-Bermudo et al., 1993). Da mit einem Spot-Test gezeigt werden konnte, daß die Sonden ausreichend markiert waren, könnte das Fehlen eines Signals in den *in situ* Hybridisierungen daran liegen, daß die mRNA in dem zur Sonde homologen Bereich durch die Ausbildung von sekundären Strukturen nicht von der Sonde erkannt werden kann. Alternativ könnte eine weiter 3' liegende Sonde verwendet werden. Es sollte dabei aber wiederum darauf geachtet werden, daß die bHLH Domäne nicht Teil der Sonde ist. Aufgrund der starken Homologien in dieser Domäne könnten sonst andere bHLH-Gene von der Sonde erkannt werden. Eine andere, mögliche Ursache für die nicht erfolgreiche Detektion von *lethal of scute* könnte in einem niedrigen Expressionslevel oder in einer geringen Stabilität der entsprechenden mRNA liegen. Es kann also über eine tatsächliche Expression von Lethal of scute im viszeralem Mesoderm keine abschließende Aussage gemacht werden.

6.2.1 Das RNAi-*l'sc* Konstrukt bewirkt einen partiellen Verlust der Founderzellen im viszeralem Mesoderm

Da für das Gen *lethal of scute* (*l'sc*) keine mutante Fliegenlinie vorhanden war, wurde die Methode der RNA-Interferenz angewandt, um Hinweise auf die Auswirkungen einer Mutation auf die Entwicklung des viszeralem Mesoderms zu erhalten. Diese posttranskriptionellen Genunterdrückung involviert mehrere Enzyme. Die dsRNA wird zunächst von dem Enzym Dicer in relativ kleine, 21-23 Nukleotid lange dsRNA's zerteilt, die als siRNA's (small interfering RNA) bezeichnet werden. Der RNA-Strang, welcher komplementär zur Ziel-RNA ist, wird nun in einen Multi-Protein-Komplex inkorporiert, welcher RISC (RNA-induced-silencing-complex) genannt wird und durch ATP aktiviert wird. RISC enthält eine Endonuklease, welche die Ziel-RNA in der Region zerschneidet, in der sie komplementär zur siRNA ist und daher mit dieser hybridisiert. Die siRNA steht danach wieder für die Teilnahme an RISC bereit (Übersichtsartikel: Scherer und Rossi, 2003).

Ursprünglich wurde diese Methode im Nematoden *Caenorhabditis elegans* entwickelt, in dessen Embryonen dsRNA injiziert wurde (Fire et al., 1998). Die Nachteile der Injektion von dsRNA bestehen darin, daß jeder injizierte Embryo einzeln manipuliert werden muß und somit ein hoher experimenteller Aufwand entsteht. Außerdem kann ein Gen, welches in

mehreren Stadien oder Geweben eine Rolle spielt, nicht gezielt für nur einen dieser Entwicklungsschritte ausgeschaltet werden. Einen Ausweg bieten hier stabile Transgene, die eine stadien- und gewebe-spezifische Expression der dsRNA *in vivo* erlauben. Diese Strategie wurde inzwischen in *C. elegans* (Tavernarakis et al., 2000), *Drosophila* (Fortier und Belote, 2000; Lam und Thummel, 2000; Piccin et al., 2001; Giordano et al., 2002) und *Arabidopsis* (Chuang und Meyerowitz, 2000) erfolgreich zur posttranslationalen Genkontrolle eingesetzt. Bei dieser sogenannten induzierbaren RNAi wurden in der Regel rekombinante, palindromische cDNA-Fragmente exprimiert. Diese werden durch eine nicht komplementäre Linker-Sequenz voneinander getrennt, so daß sie aufgrund der Selbstkompatibilität einen intramolekularen RNA-Doppelstrang ausbilden, wobei die Linker-Sequenz eine Schleife ausbildet. Diese palindromischen Sequenzen scheinen aber eine hohe Instabilität in *E. coli* aufzuweisen, so daß häufig von der Unklonierbarkeit solcher Konstrukte berichtet wird (Fortier und Belote, 2000; Lam und Thummel, 2000; Piccin et al., 2001).

Eine Alternative bietet die symmetrische Transkription des *sense* und *antisense* Stranges eines cDNA-Fragments, welches auch zur posttranskriptionellen Inaktivierung des *white* Gens verwendet wurde (Giordano et al., 2002). Die räumliche Nähe der beiden Transkripte sollte eine Hybridisierung begünstigen und so RNAi ermöglichen.

Die Expression des mit Hilfe des *UAS-GAL4*-Systems symmetrisch transkribierten Fragmentes der *lethal of scute* cDNA im viszeralen Mesoderm bewirkt einen partiellen Verlust der Founderzellen im viszeralen Mesoderm. Dieser Phänotyp ist identisch zu dem *achaete-scute* (*ac-sc*) defizienter Embryonen. Dies spricht dafür, daß der in der *ac-sc* Defizienz beobachtete Phänotyp auf den Verlust des *l'sc* Genlokus zurückzuführen ist und nicht durch den Verlust anderer, in der Defizienz deletierter Gene hervorgerufen wird. Eine Unterscheidung der einzelnen viszeralen Founderzellen analog zur Unterscheidung der einzelnen Neuroblasten ist nur bedingt möglich (San Martin et al., 2001). Daher konnte nicht geklärt werden, ob auch im viszeralen Mesoderm durch unterschiedliche mutante Situationen, unterschiedliche Founderzellen betroffen sind, wie dies bei den Neuroblasten der Fall ist (Martín-Bermudo et al., 1993).

Giordano et al., (2002) haben gezeigt, daß die Silencing-Wirkung von symmetrisch transkribierten DNA-Fragmenten deutlich niedriger ist, als sie durch IR-Konstrukte oder die Injektion der dsRNA hervorgerufen werden kann. Da jedoch die Effekte des *l'sc*-RNAi-Konstruktes ebenso stark sind, wie sie in den defizienten Embryonen beobachtet wurden, kann davon ausgegangen werden, daß der Silencing-Effekt des symmetrisch transkribierten Konstruktes in diesem Fall ausreichend ist. Der partielle Verlust der Founderzellen wurde auch durch das RNAi-*l'sc*-Konstrukt alleine hervorgerufen, ohne daß dessen Expression mit

einer *GAL4*-Treiberlinie initiiert wurde. Da diese Effekte aber wesentlich schwächer sind, als in den Embryonen, in denen die Expression durch einen Treiber bewirkt wurde, kann davon ausgegangen werden, daß sie auf der basalen Promotoraktivität des im *UAS*-Konstrukt enthaltenen Hsp70 Promotor inklusive TATA-Box beruhen. Daher scheinen schon geringe Mengen an *l'sc* dsRNA zur posttranskriptionellen Reprimierung ausreichend zu sein.

In situ Hybridisierungen mit der gewählten *l'sc* Sonde zeigten weder beim Nachweis der wildtypischen Expression, noch bei den RNAi-*l'sc*-Konstrukten ein Signal. Es konnten daher weder die *sense* noch die *antisense* Transkripte des *l'sc*-RNAi-Konstruktes nachgewiesen werden. Eine Sequenzierung des in das Konstrukt neu eingebrachten *UAS*-Promotorbereichs war, wahrscheinlich auf Grund von Aneinanderlagerung der beiden gegenläufigen, komplementären *UAS*-Sequenzen, nicht erfolgreich. Daher besteht die Möglichkeit, daß diese neue *UAS*-Sequenz nicht vollständig ist, oder trotz der Verwendung von proof-reading *Taq*-Polymerase Fehler in ihrer Sequenz aufweist. Dies könnte die Funktion dieses neuen *UAS*-Promotorbereichs beeinträchtigen. Allerdings konnte auch das Transkript, welches von der ursprünglich im Vektor vorhandenen *UAS*-Sequenz hervorgerufen wird, nicht detektiert werden. Diese Ergebnisse, zusammen mit dem fehlenden Nachweis der wildtypischen Expression, sprechen dafür, daß das Fehlen eines Signals durch die mangelhafte *in situ* Hybridisierung bedingt ist. Durch die hervorgerufenen Effekte scheint es jedoch wahrscheinlich, daß das Konstrukt aktiv ist.

Zusammenfassend kann davon ausgegangen werden, daß aufgrund des beobachteten, partiellen Verlusts der Founderzellen in *ac-sc* mutanten Embryonen, welcher ebenso durch das *l'sc*-RNAi-Konstrukt hervorgerufen wurde, sowie die durch die Überexpression von *l'sc* bewirkte Erhöhung der Zahl der Founderzellen, eine Rolle für Lethal of scute in der Determination von einem Teil der viszeralen Founderzellen wahrscheinlich ist. Allerdings sollte in folgenden Experimenten eine endogene Expression des Proteins in den Zellen des viszeralen Mesoderms gezeigt werden, um auszuschließen, daß die Defekte auf nicht endogenen Effekten beruhen, oder durch Effekte in anderen Geweben hervorgerufen werden.

6.3 Die Funktion des Notch-Signalweges bei der Determination der Founderzellen des viszerale Mesoderms

6.3.1 Notch wirkt im viszerale Mesoderm nicht über den kanonischen Signalweg

Der Notch-Signalweg ist an vielen Determinationsprozessen in unterschiedlichen Geweben und Organismen beteiligt (Übersichtsartikel: Artavanis-Tsakonas et al., 1999; Lai, 2004). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß das Fehlen von Notch oder seine ektopische Aktivierung in den Zellen des viszerale Mesoderms Auswirkungen auf die Determination der Founderzellen in diesem Gewebe hat. Dies ist analog zu seiner Funktion in der somatischen Muskulatur. In Notch mutanten Embryonen, oder Embryonen in denen eine dominant-negative Form von Notch im viszerale Mesoderm exprimiert wurde, ist die Zahl der Founderzellen deutlich erhöht, während die Überexpression einer aktivierten Form von Notch im Fehlen der Founderzellen resultiert (siehe Abschnitt 5.5). Diese Ergebnisse gehen konform mit der postulierten Funktion von Notch in diesem Gewebe (Stute et al., 2004).

Betrachtet man allerdings andere Komponenten des Signalweges, wie sie für die meisten Gewebe beschrieben wurden (Übersichtsartikel: Artavanis-Tsakonas et al., 1999; Lai, 2004), so zeigt sich, daß hier deutliche Unterschiede zwischen somatischem und viszerale Mesoderm vorhanden sind. Die Metalloprotease Kuzbanian, die an der Prozessierung des Notch-Rezeptors nach der Bindung des Liganden beteiligt ist (Lieber et al., 2002), scheint keinen Einfluß auf die Determination der Founderzellen in der viszerale Muskulatur zu haben. Auch fehlt eine Aktivierung des *Gbe-Su(H)-lacZ*-Konstruktes, welches als Reporterkonstrukt für die Aktivität des Notch-Signalweges genutzt wurde (Furriols und Bray, 2001; Abschnitt 5.6 bis 5.7). Eine Erklärung dafür könnte in der Tatsache liegen, daß das Reporterkonstrukt und die untersuchten Komponenten nur am kanonischen Notch-Signalweg beteiligt sind, der in den meisten Geweben für die Weiterleitung des Notch-Signals sorgt.

Neben diesem kanonischen Signalweg gibt es allerdings noch einen alternativen Notch-Signalweg, der sowohl in Vertebraten, als auch in Invertebraten in unterschiedlichen Geweben beobachtet wurde (Matsuno et al., 1995, 1997; Shawber et al., 1996; Lipoxygakis et al., 1998; Rusconi and Corbin et al., 1998; Brennan et al., 1999 a, b; Lawrence et al., 2001; Romain et al., 2001; Hu et al., 2003). In diesen Untersuchungen wurden Su(H) und Dl unabhängige Funktionen von Notch unter anderem in der Selektion der Muskelvorläuferzellen (Brennan et al., 1999b, Rusconi und Corbin, 1998), bei der Aktivierung eines viszerale Enhancer Elements ($Ubx^{VM}B$; Lawrence et al., 2001) sowie der Determination der

Sinnesorgan-Vorläuferzellen (SOP's) (Brennan et al., 1999a; Romain et al., 2001; Brennan und Gardner, 2002) festgestellt.

Zusammen ergeben die hierbei gewonnenen Erkenntnisse das folgende Bild für den alternativen Notch-Signalweg. Es wird angenommen, daß der alternative Notch-Signalweg über Wingless-Signale (Wg) reguliert wird. Wg wird vermutlich zur initialen Determination der Zellgruppen benötigt, in denen später über den Prozeß der lateralen Inhibition (kanonischer Notch-Signalweg) die Progenitorzellen determiniert werden (Brennan et al., 1999b). Wingless reprimiert die Aktivität des Notch-Signalweges sowohl direkt als auch indirekt über einen Effektor des Wingless-Signalweges, Disheveled (Dsh). Dsh interagiert mit den EGF-repeat 18 des Notch-Rezeptors. Fehlt diese Repression durch Wg, so unterdrückt Notch über seinen Effektor Deltex die Expression der Gene des *achaete-scute* Komplexes (Übersichtsartikel: Brennan und Gardner, 2002). Eine Interaktion zwischen den Ankyrin-repeats von Deltex und der intrazellulären Domäne von Notch konnte gezeigt werden (Diederich et al., 1994). In Zellkultur-Experimenten zeigte sich zudem, daß diese Notch-Deltex Interaktion die Weiterleitung des Notch-Signals über Su(H) verhindert (Matsuno et al., 1995), da diese Ankyrin-repeats ebenfalls mit Su(H) interagieren und durch Deltex blockiert werden (Fortini und Artavanis-Tsakonas, 1994). Eine weitere Komponente des Signalweges ist Shaggy, eine Glykogen-Synthase-Kinase 3 (GSK3). Sie wirkt als negativer Regulator des Wingless-Signalweges und beeinflußt so den alternativen Notch-Signalweges (Romain et al., 2001; Brennan und Gardner, 2002). Diese unterschiedlichen Interaktionen sind in Abb. 6.1 zusammengefaßt.

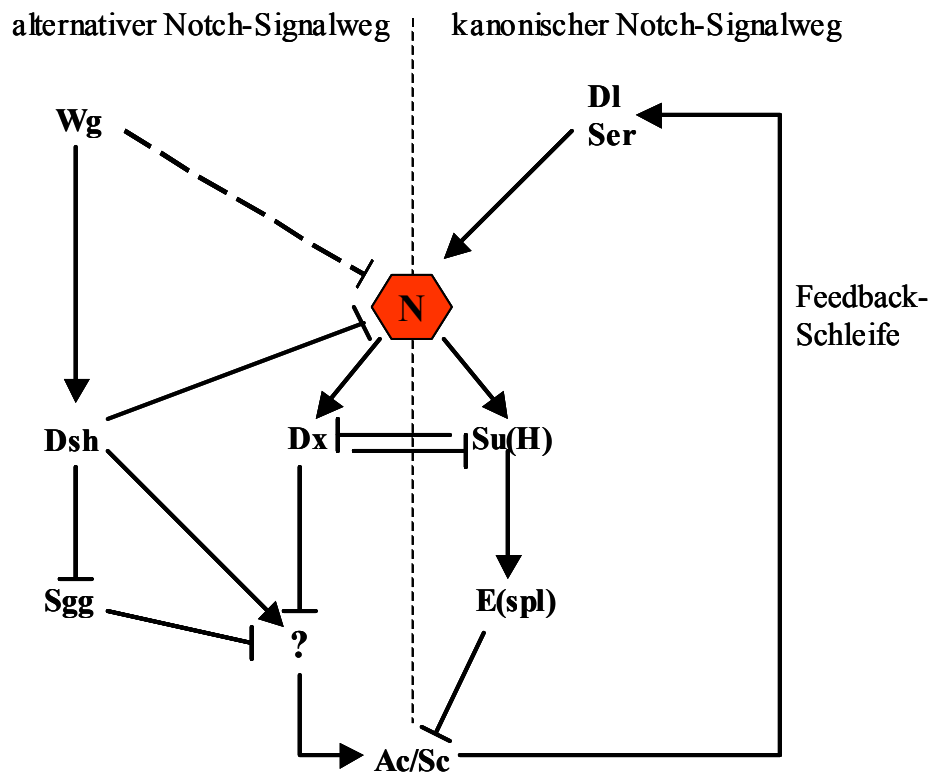


Abb. 6.1: Modell zur Darstellung der Komponenten des kanonischen und alternativen Notch-Signalweges (verändert nach Ramain et al., 2001). Der kanonische Notch-Signalweg vermittelt die laterale Inhibition über Suppressor of hairless [Su(H)] und Enhancer of split [E(spl)], welches dann die Expression der Gene des *achaete-scute* (*ac-sc*) Komplexes unterdrückt. Diese wiederum regulieren die Expression der Liganden von Notch. Der alternative Notch-Signalweg steht wahrscheinlich in enger Verbindung mit dem Wingless Signalweg und wird über Deltex (Dx) vermittelt. Dx reprimiert wahrscheinlich einen noch unbekannten Faktor, der die Expression von *ac-sc* aktiviert. Dishevelled (Dsh) und eventuell auch Wingless (Wg), reprimieren die zytoplasmatische, Dx vermittelte Notch Aktivität. Der unbekannter Faktor wird wahrscheinlich durch Dsh, Dx und Shaggy (Sgg), einem downstream-Effektor von Dsh, reguliert. Eine gegenseitige Regulation der beiden Signalwege erfolgt über Dx und Su(H). Positive Regulationen sind mit einem Pfeil, negative Regulationen mit einem Pfeil mit abschließendem Balken gekennzeichnet.

Neben dem alternativen Notch-Signalweg, der wahrscheinlich für die Repression der Differenzierung mesodermaler Zellen vor dem Prozeß der lateralen Inhibition essentiell ist, wurde kürzlich eine weitere, zu einem noch früheren Zeitpunkt benötigte Funktion von Notch beschrieben. Dabei ist Notch an der Unterteilung des Mesoderms beteiligt, indem es über Su(H) die Expression von *twist* reguliert. Su(H) wirkt hierbei sowohl direkt auf den *twist*-Promotor, als auch indirekt über sogenannte „*twist*-Repressoren“, die wahrscheinlich durch die *E(spl)*-Komplex Gene und *extra machrochaetae* kodiert sind (Tapanes-Castillo und Baylies, 2004).

Es wäre möglich, daß Notch im viszeralem Mesoderm ausschließlich für den Prozeß benötigt wird, der die Zellen in einem undifferenzierten Zustand hält. Die Selektion der

Founderzellen würde dann nicht durch den Prozeß der lateralen Inhibition erfolgen, sondern durch die Aufhebung dieser Repression in einigen Zellen durch einen anderen Faktor. Ob dieser Faktor wie in den anderen Geweben gezeigt durch *wg* kodiert wird oder ob dies durch einen anderen Faktor bewirkt wird, muß in weiteren Experimenten geklärt werden. Bislang konnte die Expression von *Wg* nur in einer Subpopulation der Founderzellen festgestellt werden (San Martin et al., 2001).

6.3.2 Delta könnte der Notch-Ligand im viszeralem Mesoderm sein

Über die am alternativen Notch-Signalweg beteiligten Komponenten und deren Wirkungsweisen sind bislang nur wenige Untersuchungen durchgeführt worden. Bezüglich der Liganden Delta und Serrate wird angenommen, daß sie in diesem Fall keinen Einfluß auf die Aktivierung des Notch-Rezeptors haben. Die Hinweise hierfür stammen wiederum aus Untersuchungen zur Determinierung von Muskelvorläufern in der somatischen Muskulatur. Es zeigte sich dabei, daß *Notch* holonull Embryonen, denen sowohl das zygotische als auch das maternale Protein fehlt, ca. doppelt so viele Muskelvorläufer bilden, wie *Delta* holonull Embryonen. Aus diesen Ergebnissen wurde gefolgert, daß Notch neben dem bekannten, von Delta induzierten Signalweg auch unabhängig von diesem wirken kann (Rusconi und Corbin, 1998). Auch bei der Determinierung der Microchaeten im Thorax von *Drosophila* wird ein Mechanismus unabhängig von Delta postuliert (Romain et al., 2001).

Im Nervensystem von Wirbeltieren konnte zudem ein neuer Ligand für Notch identifiziert werden, der nicht den klassischen Aufbau eines DSL (Delta-Serrate-LAG) Liganden mit mehreren EGF-repeats aufweist. Dieser F3/contactin genannte Ligand gehört zur Immunoglobulin-Superfamilie und ist in die Reifung und Myelinierung von Oligodendrocyten involviert (Hu et al., 2003).

Die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse bezüglich der Beteiligung von Delta an der Determination der Founderzellen im viszeralem Mesoderm von *Drosophila* sind nicht eindeutig. Einige der Analysen sprechen eher dafür, daß dieser Ligand nicht an der Determination der Founderzellen in der viszeralem Muskulatur beteiligt ist. Zum einen ist Delta nicht in den Zellen des viszeralem Mesoderms exprimiert. Allerdings konnte der Ligand in den Zellen, die sich in direkter Nachbarschaft zu denen des viszeralem Mesoderms befinden, detektiert werden. Es könnte also eine nicht endogene Aktivierung des Notch-Rezeptors aus den angrenzenden Geweben erfolgen. Zum anderen führte die Überexpression des Liganden im viszeralem oder im gesamten Mesoderm zu keinem Phänotyp. Aber auch dies

könnte darin begründet sein, daß der Ligand nicht den limitierenden Faktor im Signalweg darstellt und immer genügend Signal vorhanden ist, um Notch zu aktivieren. In *Delta* mutanten Embryonen hingegen scheint die Zahl der Founderzellen allerdings erhöht zu sein, dieser Effekt könnte aber auch darauf beruhen, daß diese Mutanten insgesamt eine sehr gestörte Morphologie aufweisen. Eine Klärung dieser Frage könnte durch die Überexpression einer dominant-negativen Form von Delta im Mesoderm erfolgen. Ein solches Konstrukt steht aber zur Zeit nicht zur Verfügung und müßte in folgenden Arbeiten etabliert werden. Zu diesem Zeitpunkt kann also eine Beteiligung von Delta an der Determination der Founderzellen in der viszerale Muskulatur noch nicht ausreichend geklärt werden.

6.3.3 Kuzbanian ist nicht an der Notch-Prozessierung im viszerale Mesoderm beteiligt

In *kuzbanian* (*kuz*) mutanten Embryonen, oder Embryonen in denen eine dominant-negative Form von Kuzbanian im viszerale Mesoderm exprimiert wurde, kann kein signifikanter Phänotyp festgestellt werden. Wenn *kuz* am Notch-Signalweg in der viszerale Muskulatur beteiligt wäre, würde hier ein Phänotyp analog zu den Notch mutanten Embryonen erwartet werden. Eine Erhöhung der Zahl der Founderzellen konnte aber nicht beobachtet werden.

Die Funktion der Metalloprotease Kuzbanian im alternativen Notch-Signalweg wurde mit Hilfe von Deletionen in der extrazellulären Domäne von Notch untersucht. Durch eine Deletion im Bereich der EGF-Repeats 10-12 der extrazellulären Domäne von Notch wird ein Phänotyp in den Sinnesorgan-Vorläuferzellen hervorgerufen, der nicht durch die Abwesenheit von Su(H) verändert wird, was auf den alternativen Signalweg hindeutet. Ebenso beeinflusst Kuzbanian, den in *Notch* Mutanten hervorgerufenen Phänotyp, nicht. Dieses Ergebnis wäre zu erwarten, wenn die deletierten Bereiche am kanonischen Notch-Signalweg beteiligt sind (Brennan et al., 1999a). Daher wird davon ausgegangen, daß Kuzbanian nicht am alternativen Notch-Signalweg in der Entwicklung der SOP's beteiligt ist. Andere Gewebe, in denen ein alternativer Notch-Signalweg postuliert wurde, wurden nicht auf die Beteiligung von Kuzbanian an der Notch-Prozessierung untersucht. Der alternative Notch-Signalweg scheint daher bei der Determination der SOP's unabhängig von der Prozessierung von Notch durch Kuzbanian zu erfolgen. Der fehlende Phänotyp in *kuzbanian* mutanten Embryonen im viszerale Mesoderm unterstützt somit die Hypothese, daß Notch in diesem Gewebe ebenfalls über den alternativen Signalweg wirkt.

6.4 Effektivität des Screens der Kollektion der EMS-mutagenisierten Fliegen

Die Kollektion der Fliegenlinien mit einer letalen Mutation auf dem 2. oder 3. Chromosom wurde durch FasciclinIII-Nachweis (FasIII; Patel et al., 1987) nach Defekten im viszeralem Mesoderm durchgemustert. Diese Methode hat den Vorteil, daß die sehr zuverlässige Antikörperfärbung eine hohe Effektivität der Analyse gewährleistet. Außerdem wird FasIII im viszeralem Mesoderm in allen Stadien der Entwicklung exprimiert und erlaubt durch die Lokalisation von FasIII an der Membran der Zellen eine Aussage über deren Morphologie. Dadurch können auch die zwei Zellpopulationen der Founderzellen und FCM's gut unterschieden werden. Mit diesem Ansatz können so die meisten Defekte im viszeralem Mesoderm erkannt und analysiert werden.

Ein Nachteil der FasIII-Nachweismethode besteht darin, daß Mutationen, die in einer Erhöhung der Zahl der Founderzellen resultieren, leicht übersehen werden können. Dies beruht zum einen auf der Tatsache, daß im Wildtyp die Founderzellen kurz nach dem Auftreten des geschlossenen Bandes des viszeralem Mesoderms eine Teilung vollziehen und sich so in ihrer Anzahl sehr schnell erhöhen. Aufgrund der allgemeinen Morphologie der Embryonen ist es sehr schwer zwischen diesen beiden Stadien in der Entwicklung des viszeralem Mesoderms zu unterscheiden. Zum anderen wird im Zuge der im frühen Stadium 12 einsetzenden Fusionen der Anteil der stark FasIII exprimierenden, rechteckigen Founderzellen, gegenüber den schwach globulären FCM's weiter erhöht. Diese sind zudem wegen ihrer schwachen FasIII-Expression in den Färbungen oft schwer zu erkennen, so daß ihr Fehlen in den Mutanten nicht leicht zu detektieren ist. Da außerdem die Founderzellen, auch ohne die Fusion mit den FCM's, in der Lage sind, ein wildtypisches viszerales Mesoderm auszubilden, wie sich in *sns* mutanten Embryonen gezeigt hat (Klapper et al., 2002), können in späteren Stadien in der Regel keine Defekte beobachtet werden. Diese Umstände führen dazu, daß beim Durchmustern der Kollektion mit FasIII-Nachweisen Mutationen, die eine Erhöhung der Zahl der Founderzellen und eine Erniedrigung der Zahl der FCM's bewirken, nur schwer erkannt werden können. Zu diesem Zweck müßten die Embryonen mit einem Marker für die FCM's durchgemustert werden. Hier würde sich *sns* anbieten, ein Gen, welches nur in den FCM's exprimiert wird. Allerdings sind für diesen Faktor gegenwärtig keine Antikörper in ausreichender Menge vorhanden. Die Detektion von *sns* erfolgt daher in der Regel durch *in situ* Hybridisierungen, welche jedoch aufgrund ihrer Aufwendigkeit für diesen Screen nicht verwendet wurden.

Ein weiteres Problem beim Durchmustern der Embryonen bestand darin, daß bei den EMS-mutagenisierten Fliegenlinien kein Blaubalancer eingesetzt wurde. Hierdurch wurde die Unterscheidung zwischen Phänotypen, die durch den homozygoten Balancer und solchen, die durch die homozygote Mutation hervorgerufen wurden, erschwert. Dadurch besteht die Möglichkeit, daß nicht alle für die Entwicklung des viszerale Mesoderms essentielle Mutationen richtig erkannt wurden.

6.5 *milliways*^{Alk} und *jelly belly*^{weli} sind essentiell für die Ausbildung des viszerale Mesoderms

Die Analyse der Mutanten V1 und V2 zeigte, daß sie neue Allele des sekretierten Faktors Jelly belly und der Rezeptor-Tyrosin-Kinase (RTK) Alk darstellen. Der *jeb*-Genloкус kodiert für drei unterschiedliche Transkripte von denen zwei in der frühen bis mittleren Embryogenese detektiert werden können. Diese zwei haben denselben open reading frame (ORF) und unterscheiden sich nur in den 5' und 3' untranslatierten Regionen (UTR). Das dritte Transkript kann später in der Embryogenese ausschließlich im zentralen Nervensystem detektiert werden. Das durch *jeb* codierte Protein enthält eine N-terminale Signalsequenz zur Sekretion und einen LDL-Rezeptor-Repeat am C-Terminus. Es wird vom Stadium 8 bis zum Stadium 11 in den ventralen mesodermalen Zellen exprimiert (Weiss et al., 2001).

Der Genloкус der RTK *Alk* besteht aus acht Exons. Alternatives Splicing konnte nur in der 5'UTR beobachtet werden. Das durch *Alk* codierte Protein besteht aus einer N-terminalen Signalsequenz für den Transport an die Membran, einer LDL- und einer MAM-Domäne, einer Glycin-reichen Region, sowie einer zytoplasmatischen PTK-Domäne. Alk wird ab dem Stadium 11 im viszerale Mesoderm und ab dem Stadium 13 im zentralen Nervensystem exprimiert (Lóren et al., 2001).

In den beiden neu identifizierten *jeb*^{weli} und *mili*^{Alk} Mutanten fehlen die Founderzellen des viszerale Mesoderms, während die verbleibenden Zellen zu FCM's ausdifferenzieren. In der somatischen Muskulatur konnte zunächst kein Phänotyp in den *jeb*^{weli} und *mili*^{Alk} mutanten Embryonen beobachtet werden. Allerdings zeigte sich in *sns in situ* Hybridisierungen, daß in diesen Mutanten die FCM's des somatischen Mesoderms fehlen. Dieser Verlust wird anscheinend durch die FCM's der viszerale Muskulatur ausgeglichen, so daß die somatische Muskulatur fast wie im Wildtyp ausgebildet wird. Diese Beteiligung von Jeb und Alk an der Differenzierung der FCM's des somatischen Mesoderms wird offensichtlich durch eine

transiente Expression von Alk im einigen Zellen des somatischen Mesoderms im Stadium 11 vermittelt (Stute et al., 2004).

Eine Kolokalisation des sekretierten Jeb und der RTK Alk an der Membran der Founderzellen, sowie das Ausbleiben der Jeb-Lokalisation an der Membran in *mili^{Alk}* mutanten Embryonen weisen darauf hin, daß Jeb der Ligand für die RTK Alk ist. Ein Zusammenwirken im gleichen Signalweg wird auch durch die fehlende Aktivierung des RTK-Signalweges in *jeb^{weli}* Mutanten gezeigt. Dies kann durch das Fehlen von phosphoryliertem ERK in Antikörperfärbungen an *jeb^{weli}* Mutanten detektiert werden (Stute et al., 2004). Die Tatsache, daß Jeb als Ligand für Alk wirkt wurde kürzlich auch von zwei anderen Arbeitsgruppen bestätigt. Sie konnten zum einen zeigen, daß Säugetier-Zell-Linien, die ein Fusions-Protein aus Jeb und der alkalischen Phosphatase exprimieren, an Zellen binden, die Alk exprimieren. Diese Bindung wurde durch die Deletion der LDL-Domäne des Liganden aufgehoben (Lee et al., 2003). Eine Interaktion konnte auch durch Co-Immunopräzipitations-Experimente und enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) bestätigt werden (Englund et al., 2003).

Alk wird auch für die *shibire* vermittelte Endocytose des Liganden (Weiss et al., 2001) benötigt. Dies konnte von Englund et al., (2003) anhand der Analyse von Mutanten gezeigt werden, denen die intrazelluläre Domäne von Alk fehlt, deren extrazelluläre Domäne aber weiterhin in der Lage ist an den Liganden zu binden. In diesen Mutanten bleibt das Jeb-Protein bis zum Stadium 13 an der Membran der Founderzellen gebunden, während es im Wildtyp zu diesem Zeitpunkt schon von den Zellen aufgenommen wurde. Für diese Jeb-Aufnahme ist ebenfalls die PTK-Domäne des Rezeptors verantwortlich, da Punktmutationen in entscheidenden Aminosäuren dieser Domäne ausreichend sind, um die Jeb-Aufnahme zu verhindern (Englund et al., 2003).

Insgesamt kann die Wirkung von Mili/Alk vermitteltem Jeb-Signal während der Determination und Differenzierung im viszeralem und somatischem Mesoderm wie folgt beschrieben werden (Abb. 6.2). Die Expression von Alk im Mesoderm beginnt im Stadium 10 in allen Zellen des viszeralem Mesoderms (vm), die gleichzeitig durch die Expression von Bagpipe (bap) charakterisiert sind. Außerdem kann Alk auch in einigen Zellen des somatischen Mesoderms (sm) sowie des Ektoderms (ecto) beobachtet werden. Die Zellen des somatischen Mesoderms exprimieren und sekretieren Jeb. Das Jeb-Signal wird zum einen von den Zellen des viszeralem Mesoderms aufgenommen, die dem Ort der Sekretion im somatischen Mesoderm am nächsten liegen. Hier wird der MAPK-Signalweg aktiviert, der zu der Phosphorylierung von ERK zu dpERK führt. Diese Zellen differenzieren zu Founderzellen (f) und exprimieren Duf/Kirre, während alle anderen Zellen des viszeralem Mesoderms zu FCM's werden und Sns exprimieren. Zum anderen benötigen einige Zellen des

somatischen Mesoderms das Jeb-Signal, um zu FCM's zu differenzieren und weiter in der Lage zu sein, Jeb zu sekretieren (Stute et al., 2004).

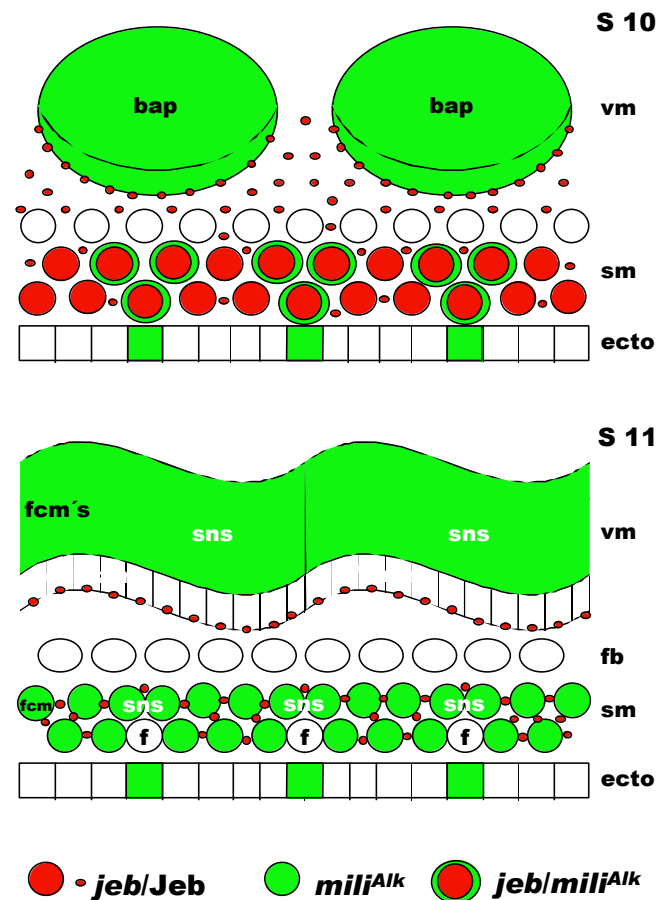


Abb. 6.2: Schematische Darstellung des Mili/Alk vermittelten Jeb-Signals. (Erläuterungen siehe Text).

Dieser neu identifizierte Signalweg, der über den Liganden Jeb und die RTK Mili^{Alk} wirkt, stellt also neben den DER- und Heartless-vermittelten Signalwegen einen dritten MAP-Kinase Signalweg dar, der wichtig für die Differenzierung der mesodermalen Gewebe ist. DER ist neben vielen anderen Entwicklungsprozessen für die Determination der Muskel-Vorläuferzellen im somatischen Mesoderm notwendig (Buff et al., 1998; Übersichtsartikel: Shilo, 2003). Heartless hingegen mit seinen beiden erst kürzlich identifizierten Liganden Pyramus und Thisbe (Stathopoulos et al., 2004) ist zunächst wichtig für die Ausbreitung des Mesoderms unter dem Neuroektoderm. Später spielt dieser Signalweg eine wichtige Rolle bei der Spezifizierung des Herzens und der viszeralen Muskulatur des Enddarms (Beiman et al., 1996; Gisselbrecht et al., 1996). Damit konnte mit dem Jeb/Alk Signalweg nun ein MAPK-

Signalweg spezifisch für die Determination der Founderzellen in der viszerale Muskulatur, sowie der FCM's in der somatischen Muskulatur identifiziert werden.

6.5.1 Eine aktivierte Form von Alk konvertiert nicht alle Zellen des viszerale Mesoderms zu Founderzellen

Der Phänotyp der beiden Mutanten *jeb^{weli}* und *mili^{Alk}* konnte durch die Expression der entsprechenden Wildtyp cDNA's in den Mutanten gerettet werden. Eine Rettung war auch durch die Überexpression einer aktivierten Form von Alk (Alk^{act}) möglich. Diese aktivierte Form von Alk ist vom Liganden unabhängig (Englund et al., 2003). Sie kann dadurch erhalten werden, daß die N-terminale Region von human Nukleophosmin (NPM) an die C-terminale Domäne von Alk fusioniert wird. Durch die in NPM enthaltene Oligomerisierungs-Domäne lagern sich wahrscheinlich die NPM-Alk Fusionsproteine aneinander an und bewirken dadurch die konstitutive Aktivierung von Alk, die sonst durch Liganden vermittelte Dimerisierung erfolgt. Ein solches Fusionsprotein (NPM-Alk) entsteht auch bei der Translokation t(2;5), welche zu Anaplastic large cell Lymphomen führt. In diesen Tumoren wurde Alk erstmals identifiziert (Übersichtsartikel: Duyster et al., 2001; Pulford et al., 2004).

Die RTK Alk ist im Wildtyp in allen Zellen des viszerale Mesoderms exprimiert. Die Beschränkung des aktiven Signalweges wird wahrscheinlich durch eine limitierte Menge an Ligand hervorgerufen. Dies wird dadurch bestätigt, daß durch Überexpression des Liganden Jeb alle Zellen des viszerale Mesoderms zu Founderzellen werden. Potentiell sind also alle Zellen des viszerale Mesoderms in der Lage, zu Founderzellen zu differenzieren. Die Tatsache, daß durch die Expression von Alk^{act} jedoch nur einen Teil der viszerale Zellen zu Founderzellen wird, jedoch immer noch FCM's zu beobachten sind, könnte daran liegen, daß die Expression von Alk^{act} durch die verwendete *GAL4*-Treiberlinie, *bap-GAL4* in einigen Zellen nicht stark genug ist, so daß diese nicht zu Founderzellen differenzieren. Auch in der Arbeit von Lee et al., (2003) wurde die *bap-GAL4*-Treiberlinie verwendet, um eine aktivierte Form von Alk zur Rettung des *jeb* Phänotyps einzusetzen. Darin wird zwar auch eine Verbreiterung des Bandes der Founderzellen beschrieben, aber keine Aussage darüber gemacht, ob noch FCM's vorhanden sind.

6.5.2 Die Überexpression von *UAS-Alk* phänokopiert den Verlust des Liganden Jelly belly

Erstaunlicherweise zeigte die Überexpression der RTK Alk im gesamten Mesoderm eine Phänokopie der *mili*^{Alk} bzw. der *jeb*^{weli} Mutation. Es konnte gezeigt werden, daß dieser Effekt die Situation in den *jeb*^{weli} mutanten Embryonen imitiert, da durch die Überexpression des Rezeptors in allen Zellen des Mesoderms die Expression des Liganden Jelly belly (Jeb) reduziert wird. Dies geschieht möglicherweise durch den folgenden Mechanismus: Es wird davon ausgegangen, daß in der Wildtypsituation nur die FCM's des somatischen Mesoderms Alk exprimieren, da gezeigt werden konnte, daß Alk nicht im gesamten somatischen Mesoderm exprimiert ist und nur diese Zellen in *mili*^{Alk} Mutanten betroffen sind. Daher sind ausschließlich diese Zellgruppen in der Lage, auf das Jeb-Signal zu reagieren. Der aktivierte Jeb/*Mili*^{Alk}-Signalweg bewirkt die weitere Differenzierung dieser Zellen. Um den Verlust der Jeb-Expression zu erklären, muß weiterhin davon ausgegangen werden, daß nur die FCM's des somatischen Mesoderms in der Lage sind Jeb zu sekretieren. Sie beginnen zunächst mit der Sekretion, benötigen dann aber selbst das Signal zur weiteren Differenzierung und damit zur Aufrechterhaltung der Jeb-Sekretion. Die Jeb-Expression im somatischen Mesoderm wird also wahrscheinlich durch eine positive Autoregulation aufrecht erhalten.

Durch die Überexpression von Alk im gesamten Mesoderm sind alle Zellen in der Lage das Signal aufzunehmen. Dies reduziert wahrscheinlich den Anteil an Jeb-Signal, der den FCM's des somatischen Mesoderms zur Aufnahme zur Verfügung steht. Dies könnte dazu führen, daß sich die FCM's nicht weiter differenzieren und aufhören, Jeb zu sekretieren. Da Jeb auch im viszeralen Mesoderm als Alk-Ligand benötigt wird kommt es auch hier zu einem Verlust des aktiven RTK-Signalwegs, was zu einem Verlust der Founderzellen in diesem Gewebe führt.

6.6 Alk scheint kein Aktivator der myogenen Differenzierung in Säugerzellen zu sein

Grundlage für die Transfektion der Säugetierzellen mit Alk war die Fragestellung, ob Alk für die Determination des myogenen Schicksals der Zellen oder eventuelle auch für die Myoblastenfusion eine Rolle spielt. Um diese Frage zu klären wurde daher sowohl eine Myoblasten- als auch eine Fibroblasten-Zell-Linie gewählt. Der Einfluß von Alk auf die

Ausbildung von Myotuben konnte in den beschriebenen Versuchen nicht anhand des Nachweises von Mhc in Western-Blot-Analysen bestimmt werden, da die Transfektionseffizienz in beiden Zell-Linien sehr gering war. Dadurch überwogen die undifferenzierten Zellen und stellten somit die größte Menge an Protein.

Allerdings konnten anhand der Färbungen an fixierten, transformierten Zellen erste Anhaltspunkte zu einer Funktion von Alk gewonnen werden. Wurde bei der myogenen Zell-Linie C2C12 durch Medienwechsel die Differenzierung zu Myotuben induziert, so hatte weder eine aktivierte (Alk^{FL}) noch eine dominant-negative Form von Alk (Alk^{EC} bzw. dnAlk) einen Einfluß auf die Fusion der Zellen oder die Expression von Mhc. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, daß zwei mit einem Alk-Konstrukt transfizierte Zellen, diese Fusion nicht mehr durchführen können, da aufgrund der geringen Transfektionseffizienz immer wesentlich mehr untransfizierte Zellen als Fusionspartner zur Verfügung standen. Sobald diese Zellen also mit der myogenen Differenzierung begonnen haben, scheint die Expression der Alk-Konstrukte keinerlei Einfluß darauf zu haben. Ob dies auch für differenzierte C3H10T1/2 Zellen gilt, konnte aufgrund der geringen Effizienz der Transfektion mit dem MyoD-Konstrukt und der damit verbundenen fehlenden Differenzierung der Zellen nicht geklärt werden.

Der Einfluß der unterschiedlichen Alk Konstrukte auf die undifferenzierten Zellen scheint hingegen wesentlich stärker zu sein. Im Falle der myogenen C2C12-Zellen bewirkt die Expression der aktivierten Alk-Formen (Alk^{FL}) eine Veränderung der transfizierten Zellen hin zu einer Neuroblasten-ähnlichen Morphologie. Gleichzeitig exprimieren diese Zellen kein Mhc mehr. Diese veränderte Morphologie konnte auch bei der Fibroblasten-Zell-Linie C3H10T1/2 festgestellt werden. Diese exprimieren allerdings nur nach der Transfektion mit MyoD das Protein Mhc. Da Kotransfektionen von dem MyoD-Konstrukt und den Alk-Konstrukten nicht erreicht wurden, kann keine Aussage darüber gemacht werden, ob die Expression der Alk^{FL} und RPTP-Alk Konstrukte auch in diesen Zellen die Mhc-Expression blockiert.

Auf der anderen Seite bewirkte die Expression der dominant negativen Form von Alk (Alk^{EC}) in der Fibroblasten-Zell-Linie C3H10T1/2 die Expression von Mhc, welches sonst nur durch die Expression eines der vier *myogenic regulatory factors* (MRF: MyoD, Myogenin, Myf5 und Mrf4) hervorgerufen wird (Olson, 1990; Weintraub et al., 1991; Wright, 1992; Lassar und Munsterberg, 1994). Ob diese Zellen ebenfalls in der Lage sind miteinander zu fusionieren, konnte nicht geklärt werden, da die transfizierten Zellen eine zu große räumliche Distanz aufwiesen. Sie scheinen jedoch nicht in der Lage zu sein, mit anderen nicht-transfizierten Zellen zu fusionieren, die in räumlicher Nähe vorhanden waren, da keine

mehrkernigen Zellen beobachtet werden konnten. Wiederum konnte über die Auswirkung dieses Alk^{EC} Konstruktes auf die undifferenzierten C2C12-Zellen keine Aussage gemacht werden, da diese Zellen immer Mhc exprimieren.

Die gemachten Beobachtungen deuten also darauf hin, daß aktivierte Formen von Alk nicht in der Lage sind, in undifferenzierten, myogenen oder Fibroblasten-Zellen die myogene Differenzierung zu induzieren. Vielmehr scheint sie blockiert zu sein, da Mhc nicht mehr exprimiert wird. Außerdem ändert sich die Morphologie der Zellen, die nun mehr an neurogene Zellen erinnert. Im Gegensatz dazu scheint der Block des Alk-Signalweges in der Fibroblasten-Zell-Linie durch dominant-negative Formen von Alk (Alk^{EC}) eine Induktion der myogenen Differenzierung zu bewirken.

Diese Ergebnisse könnten eventuell dadurch erklärt werden, daß Alk, welches im Säugetier bislang lediglich im Gehirn nachgewiesen wurde (Iwahara et al., 1997; Morris et al., 1997) eine entscheidende Rolle bei der Determination neurogener Zellschicksale besitzt und nicht an der myogenen Entwicklung in Säugetieren beteiligt ist. Wenn die myogenen Zellen durch Entzug der Wachstumsfaktoren im Medium in die myogene Differenzierung getrieben werden, so hat Alk keinen Einfluß darauf. Sind diese Zellen aber keinem myogenen Differenzierungsdruck ausgesetzt, könnte es sein, daß Alk in der Lage ist, das Zellschicksal dieser Zellen zu verändern. Eine solche Änderung des Zellschicksals auch über die Grenzen des jeweiligen Keimblattes hinaus wurde schon früher im Falle von humanen und murinen neuralen Stammzellen beschrieben, die, wenn sie zusammen mit Myoblasten kultiviert wurden, zu Muskelzellen differenzierten (Galli et al., 2000). Ebenso führte die Expression von Myf5 oder MyoD im Neuralrohr eines Hühnerembryos zur ektopischen Bildung von Muskelgewebe (Delfini und Duprez, 2003). Es scheint also eine gewisse Plastizität zwischen den Zellen der einzelnen Keimblätter zu herrschen. In der Fibroblasten Zell-Linie (C3H10T1/2) hingegen scheint ein Block des Alk-Signalweges die Differenzierung in myogene Zellschicksale zu ermöglichen. Hier scheint ein aktiver Alk-Signalweg diese myogene Differenzierung zu verhindern.

Um diese Hypothesen zu beweisen sollten allerdings, nachdem die Reproduzierbarkeit der hier gezeigten Ergebnisse sichergestellt wurde, weitere Versuche unternommen werden. Zunächst sollte geklärt werden, ob die transfizierten Zellen mit der Neuroblasten-ähnlichen Morphologie tatsächlich zu diesen differenzieren und neurale Marker exprimieren. Außerdem sollte untersucht werden, ob in den beiden Zell-Linien eine endogene Alk-Expression vorhanden ist, welche die Effekte der dominant-negativen Form von Alk (Alk^{EC}) auf die C3H10T1/2-Zellen erklären würde. Weiterhin sollte eine Aktivierung der RTK nur in dem Maße, in dem sie auch in der Zelle unter normalen Umständen exprimiert wird, durchgeführt

werden, um zu testen, ob die beobachteten Effekte allein auf die Überexpression der Konstrukte zurückzuführen ist. Hierzu könnten als Liganden entweder der in *Drosophila* identifizierte Ligand Jelly belly (Englund et al., 2003; Lee et al., 2003) oder der aus Säugetieren bekannte Ligand Pleiotrophin (Stoica et al., 2001) dem Kulturmedium zugegeben werden.

6.7 Ausblick

Notch spielt in vielen Geweben und Organismen eine wichtige Rolle bei der Zuordnung von Zellen zu einem bestimmten Zellschicksal. Die Untersuchungen zur Beteiligung von Notch an der Determination der Founderzellen in der viszerale Muskulatur von *Drosophila melanogaster* haben gezeigt, daß Notch hier nicht über den kanonischen Signalweg wirkt. Daher sollte in folgenden Experimenten weiter untersucht werden, ob Notch im viszerale Mesoderm über den alternativen Signalweg wirkt, der bereits in einigen anderen Geweben beschrieben worden ist. Bekannte Komponenten des alternativen Signalweges sind Deltex, ein Effektor von Notch, sowie Dishevelled, welches die Aktivität von Notch reprimiert und Shaggy, eine Glykogen Synthase Kinase 3, die von Dishevelled reguliert wird. Untersuchungen an Mutanten für diese Gene oder Überexpressionsexperimente mit diesen Faktoren könnten Aufschluß darüber geben, ob Notch im viszerale Mesoderm tatsächlich über diese bekannten Komponenten des alternativen Notch-Signalweges wirkt.

Der durch Jeb und Alk vermittelte Signalweg ist sowohl an der Determination der Founderzellen in der viszerale Muskulatur als auch an der Differenzierung der FCM's in der somatischen Muskulatur beteiligt. Wie dabei die unterschiedlichen Funktionen im somatischen und viszerale Mesoderm von *Drosophila* bewirkt werden ist noch unklar. Carmena et al. (2002) haben gezeigt, daß die RTK-Signalwege, die durch Heartless und DER vermittelt werden und der Notch-Signalweg bei der Selektion der Progenitorzellen im somatischen Mesoderm nicht nur antagonistische Effekte haben, sondern sich auch gegenseitig beeinflussen und regulieren. Obwohl Notch im viszerale Mesoderm im Gegensatz zum somatischen Mesoderm nicht über den Prozeß der lateralen Inhibition zu wirken scheint, ist es auch hier möglich, daß sich der Alk-vermittelte RTK- und der Notch-Signalweg gegenseitig regulieren. Um dies zu untersuchen, könnte man die Effekte einer Überexpression von Alk^{act} z.B. auf die Expression von Notch und Delta untersuchen.

Umgekehrt könnte die Überexpression einer aktivierten oder einer dominant-negativen Form von Notch Einfluß auf die Expression der RTK Alk oder des Liganden Jeb haben.

Bezüglich der Rolle der RTK-Alk in der Myogenese von Säugetieren sollten zunächst einmal die ersten, im Forschungsaufenthalt in Schweden gemachten Ergebnisse verifiziert und vervollständigt werden. Vor allem sollten Wege gefunden werden, um die Transfektionseffizienz zu erhöhen. Nachdem die gemachten Ergebnisse in einem größeren Anteil der Zellen reproduziert wurden, sollte geklärt werden, ob in den Zell-Linien tatsächlich eine endogene Expression von Alk vorhanden ist, die eine Grundlage für die aufgestellte Hypothese ist. Weiterhin sollte geklärt werden, ob die mit einer aktivierten Form von Alk transfizierten Zellen tatsächlich, wie ihre Morphologie vermuten läßt, in Neuroblasten transformiert wurden und ob sie entsprechende Marker exprimieren. Ebenso sollte getestet werden, ob diese Transformation der Zell-Linie nur durch Überexpression der RTK hervorgerufen werden kann, oder ob schon eine Aktivierung der endogenen Alk-RTK ausreicht, um die Zellen zu neurogenen Zellen zu transformieren.

Die in dieser Arbeit identifizierten sechs neuen Mutanten V3-V8 müssen im Folgenden einer Charakterisierung bezüglich der betroffenen Gene unterzogen werden. Hierzu sollten zunächst die Defizienzen, die allelisch zu den Mutanten sind, in transheterozygoter Situation getestet werden. Wenn die aus dieser Kreuzung resultierenden Embryonen denselben Phänotyp wie die mutanten Embryonen zeigen, so ist die in diesem Bereich vorhandene letale Mutation wahrscheinlich für den viszeralen Phänotyp verantwortlich. Innerhalb des so identifizierten Bereiches sollten anschließend kleinere Defizienzen und P-Elemente bezüglich ihres Komplementationungsverhaltens getestet werden, um möglicherweise das betroffene Gen zu identifizieren oder den Bereich in dem es lokalisiert ist, weiter einzuengen. Die dort vorhandenen CG's können dann anhand von *in situ* Hybridisierungen auf eine Expression im viszeralen Mesoderm getestet werden, um mögliche Kandidatengene zu erhalten. Die Bedeutung dieser Gene für den Phänotyp könnte dann durch Rettungsexperimente verifiziert werden.

Eine andere Möglichkeit zur Bestimmung des betroffenen Gens in den jeweiligen Mutanten wäre der Versuch der Rettung des Phänotyps mit Fragmenten des identifizierten genomischen Bereichs. Schließlich besteht auch die Möglichkeit eventuell im relevanten Bereich vorhandenen P-Elemente durch eine Transposase-Quelle zu aktivieren und daraus resultierende letale Fliegenlinien gegen die mutanten Allele zu testen. Sollte das P-Element in das gesuchte Gen integriert sein, könnte dieses über P-Element-Rescue Experimente isoliert werden.

7. Literatur

Artavanis-Tsakonas, S., Rand, M. D. and Lake, R. J. (1999). Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science*. **284**, 770-776.

Artero, R. D., Castano, I. and Baylies, M. K. (2001). The immunoglobulin-like protein Hibris functions as a dose-dependent regulator of myoblast fusion and is differentially controlled by Ras and Notch signaling. *Development*. **128**, 4251-4264.

Azpiazu, N. and Frasch, M. (1993). *tinman* and *bagpipe*: two homeobox genes that determine cell fates in the dorsal mesoderm of *Drosophila*. *Genes Dev.* **7**, 1325-1340.

Azpiazu, N., Lawrence, P. A., Vincent, J. P. and Frasch, M. (1996). Segmentation and specification of the *Drosophila* mesoderm. *Genes Dev.* **10**, 3183-3194.

Bate, M. (1993). The mesoderm and its derivatives. In: *The Development of Drosophila melanogaster*, Vol. 1; Bate, M. and Martinez-Arias, A. (eds.); Cold Spring Harbor Laboratory Press; Cold Spring Harbor; N.Y., 1012-1088

Bate, M. and Rushton, E. (1993). Myogenesis and muscle patterning in *Drosophila*. *C R Acad Sci III*. **316**, 1047-1061.

Baylies, M. K. and Bate, M. (1996). *twist*: a myogenic switch in *Drosophila*. *Science*. **272**, 1481-1484.

Baylies, M. K., Bate, M. and Ruiz-Gómez, M. (1998). Myogenesis: a view from *Drosophila*. *Cell*. **93**, 921-927. Review.

Beiman, M., Shilo, B. Z. and Volk, T. (1996). Heartless, a *Drosophila* FGF receptor homolog, is essential for cell migration and establishment of several mesodermal lineages. *Genes Dev.* **10**, 2993-3002.

Bilder, D. and Scott, M. P. (1998). *Hedgehog* and *wingless* induce metameric pattern in the *Drosophila* visceral mesoderm. *Dev Biol*. **201**, 43-56.

Birnboim, H. C. and Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**, 1513-1523.

Bodmer, R. (1993). The gene *tinman* is required for specification of the heart and visceral muscles in *Drosophila*. *Development*. **118**, 719-729.

Bour, B. A., Chakravarti, M., West, J. M. and Abmayr, S. M. (2000). *Drosophila* SNS, a member of the immunoglobulin superfamily that is essential for myoblast fusion. *Genes Dev.* **14**, 1498-1511.

Bour, B. A., O'Brien, M. A., Lockwood, W. L., Goldstein, E. S., Bodmer, R., Taghert, P. H., Abmayr, S. M. and Nguyen, H. T. (1995). *Drosophila* MEF2, a transcription factor that is essential for myogenesis. *Genes Dev.* **9**, 730-741.

Brand, A. H. and Perrimon, N. (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development*. **118**, 401-415.

- Bray, S. and Furriols, M.** (2001). Notch pathway: Making sense of Suppressor of Hairless. *Curr Biol.* **11**, 217-221.
- Brennan, K. and Gardner, P.** (2002). Notching up another pathway. *BioEssays.* **24**, 405-410.
- Brennan, K., Baylies, M. and Martinez-Arias, A.** (1999b). Repression by Notch is required before Wingless signalling during muscle progenitor cell development in *Drosophila*. *Curr Biol.* **9**, 707-710.
- Brennan, K., Tateson, R., Lewis, K. and Martinez-Arias, A.** (1997). A functional analysis of *Notch* mutations in *Drosophila*. *Genetics.* **147**, 177-188.
- Brennan, K., Tateson, R., Lieber, T., Couso, J. P., Zecchini, V. and Martinez-Arias, A.** (1999a). The *Abruptex* mutations of *Notch* disrupt the establishment of proneural clusters in *Drosophila*. *Dev Biol.* **216**, 230-242.
- Buff, E., Carmena, A., Gisselbrecht, S., Jimenez, F. and Michelson, A. M.** (1998). Signalling by the *Drosophila* epidermal growth factor is required for the specification and diversification of embryonic muscle progenitors. *Development.* **125**, 2075-2086.
- Cabrera, C. V.** (1990). Lateral inhibition and cell fate during neurogenesis in *Drosophila* – The interactions between *Scute*, *Notch* and *Delta*. *Development.* **110**, 733-742.
- Campos-Ortega, J. A. and Hartenstein, V.** (1997). The Embryonic Development of *Drosophila melanogaster*. Berlin: Springer-Verlag.
- Carmena, A., Bate, M. and Jimenez, F.** (1995). *lethal of scute*, a proneural gene, participates in the specification of muscle progenitors during *Drosophila* embryogenesis. *Genes Dev.* **9**, 2373-2383.
- Carmena, A., Buff, E., Halfon, M. S., Gisselbrecht, S., Jimenez, F., Baylies, M. K. and Michelson, A. M.** (2002). Reciprocal regulatory interactions between the Notch and Ras signalling pathways in the *Drosophila* embryonic mesoderm. *Dev Biol.* **244**, 226-242.
- Carmena, A., Murugasu-Oei, B., Menon, D., Jimenez, F. and Chia, W.** (1998). *Inscuteable* and *numb* mediate asymmetric muscle progenitor cell divisions during *Drosophila* myogenesis. *Genes Dev.* **12**, 304-315. Erratum in: *Genes Dev.* **12**, 1241.
- Chen, E. H. and Olson, E. N.** (2001). Antisocial, an intracellular adaptor protein, is required for myoblast fusion in *Drosophila*. *Dev Cell.* **1**, 705-715.
- Chuang, C. F. and Meyerowitz, E. M.** (2000). Specific and heritable genetic interference by double-stranded RNA in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **97**, 4985-90.
- Corbin, V., Michelson, A. M., Abmayr, S. M., Neel, V., Alcamo, E., Maniatis, T. and Young, M. W.** (1991). A role for the *Drosophila* neurogenic genes in mesoderm differentiation. *Cell.* **67**, 311-323.
- Davis, R. L., Weintraub, H. and Lassar, A. B.** (1987). Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. *Cell.* **51**, 987-1000.

- De Cellis, J. F., Barrio, R., Del Arco, A. and García-Bellido, A.** (1993). Genetic and molecular characterization of Notch mutations in its Delta- and Serrate-binding domain of *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci USA*. **90**, 4037-4041.
- Delfini, M. C. and Duprez, D.** (2003). Ectopic Myf5 or MyoD prevents the neuronal differentiation program in addition to inducing skeletal muscle differentiation, in the chick neural tube. *Development*. **131**, 713-723.
- Diederich, R. J., Matsuno, K., Hing, H. and Artavanis-Tsakonas, S.** (1994). Cytosolic interactions between Deltex and Notch ankyrin repeats implicates Deltex in the Notch signalling pathway. *Development*. **120**, 473-481.
- Doberstein, S. K., Fetter, R. D., Mehta, A. Y. and Goodman, C. S.** (1997). Genetic analysis of myoblast fusion: *blown fuse* is required for progression beyond the prefusion complex. *J Cell Biol*. **136**, 1249-1261.
- Dohrmann, C., Azpiazu, N. and Frasch, M.** (1990). A new *Drosophila* homeo box gene is expressed in mesodermal precursor cells of distinct muscles during embryogenesis. *Genes Dev*. **4**, 2098-2111.
- Duan, H., Skeath, J. B. and Nguyen, H. T.** (2001). *Drosophila* *Lame duck*, a novel member of the Gli superfamily, acts as a key regulator of myogenesis by controlling fusion-competent myoblast development. *Development*. **128**, 4489-4500.
- Duyster, J., Bai, R. Y. and Morris, S. W.** (2001). Translocations involving anaplastic lymphoma kinase (Alk). *Oncogene*. **20**, 5623-5637.
- Dworak, H. A. and Sink, H.** (2002). Myoblast fusion in *Drosophila*. *Bioessays*. **24**, 591-601. Review.
- Dworak, H. A., Charles, M. A., Pellerano, L. B. and Sink, H.** (2001). Characterization of *Drosophila hibris*, a gene related to human *nephrin*. *Development*. **128**, 4265-4276.
- Englund, C., Loren, C. E., Grabbe, C., Varshney, G. K., Deleuil, F., Hallberg, B. and Palmer, R. H.** (2003). Jeb signals through the Alk receptor tyrosine kinase to drive visceral muscle fusion. *Nature*. **425**, 512-516.
- Erickson, M. R., Galletta, B. J. and Abmayr, S. M.** (1997). *Drosophila myoblast city* encodes a conserved protein that is essential for myoblast fusion, dorsal closure, and cytoskeletal organization. *J Cell Biol*. **138**, 589-603.
- Fire, A. S., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E. and Mello, C. C.** (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. **391**, 806-811.
- Fortier, E. and Belote, J. M.** (2000). Temperature-dependent gene silencing by an expressed inverted repeat in *Drosophila*. *Genesis*. **26**, 240-244.
- Fortini, M. E. and Artavanis-Tsakonas, S.** (1994). The Suppressor of hairless protein participates in Notch receptor signaling. *Cell*. **79**, 273-282.

- Frasch, M.** (1995). Induction of visceral and cardiac mesoderm by ectodermal Dpp in the early *Drosophila* embryo. *Nature*. **374**, 464-467.
- Frasch, M.** (1999). Controls in patterning and diversification of somatic muscles during *Drosophila* embryogenesis. *Curr Opin Genet Dev*. **9**, 522-529.
- Furlong, E. E., Andersen, E. C., Null, B., White, K. P. and Scott, M. P.** (2001). Patterns of gene expression during *Drosophila* mesoderm development. *Science*. **297**, 1629-1633.
- Furriols, M. and Bray, S.** (2001). A model Notch response element detects Suppressor of Hairless-dependent molecular switch. *Curr Biol*. **11**, 60-64.
- Fuß, B. and Hoch, M.** (2002). Notch signaling controls cell fate specification along the dorsoventral axis of the *Drosophila* gut. *Curr Biol*. **12**, 171-179.
- Gabay, L., Seger, R. and Shilo, B. Z.** (1997). MAP kinase in situ activation atlas during *Drosophila* embryogenesis. *Development*. **124**, 3535-3541.
- Galli, R., Borello, U., Gritti, A., Minasi, M. G., Bjornson, C., Coletta, M., Mora, M., Cusella De Angelis, M. G., Fiocco, R., Cossu, G. and Vescovi, A. L.** (2000). Skeletal myogenic potential of human and mouse neural stem cells. *Nature neuroscience*. **3**, 986-991.
- Georgias, C., Wasser, M. and Hinz, U.** (1997). A basic-helix-loop-helix protein expressed in precursors of *Drosophila* longitudinal visceral muscles. *Mech Dev*. **69**, 115-124.
- Gilbert, S. F.** (2000). *Developmental Biology*. 6th ed. Sunderland (MA): Sinauer Associates, Inc.
- Giordano, E., Rendina, R., Peluso, I. and Furia, M.** (2002). RNAi triggered by symmetrically transcribed transgenes in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*. **160**, 637-648.
- Gisselbrecht, S., Skeath, J. B., Doe, C. Q. and Michelson, A. M.** (1996). *heartless* encodes a fibroblast growth factor receptor (DFR1/DFGF-R2) involved in the directional migration of early mesodermal cells in the *Drosophila* embryo. *Genes Dev*. **10**, 3003-3017.
- Go, M. J., Eastman, D. S. and Artavanis-Tsakonas, S.** (1998). Cell proliferation control by Notch signalling in *Drosophila* development. *Development*. **125**, 2031-2040.
- Hacker, U., Kaufmann, E., Hartmann, C., Jurgens, G., Knochel, W. and Jackle, H.** (1995). The *Drosophila* fork head domain protein crocodile is required for the establishment of head structures. *EMBO J*. **14**, 5306-5317.
- Heitzler, P., Bourouis, M., Ruel, L., Carteret, C. and Simpson, P.** (1996). Genes of the *Enhancer of split* and *achaete-scute* complexes are required for a regulatory loop between Notch and Delta during lateral signalling in *Drosophila*. *Development*. **122**, 161-171.
- Hinz, U., Giebel, B. and Campos-Ortega, J. A.** (1994). The basic-helix-loop-helix domain of *Drosophila* lethal of scute protein is sufficient for proneural function and activates neurogenic genes. *Cell*. **76**, 77-87.
- Hinz, U., Wolk, A. and Renkawitz-Pohl, R.** (1992). Ultrabithorax is a regulator of beta 3 tubulin expression in the *Drosophila* visceral mesoderm. *Development*. **116**, 543-54.

- Hu, Q. D., Ang, B. T., Karsak, W. P., Cui, X. Y., Duka, T., Takeda, Y., Chia, W., Sankar, N., Ng, Y. K., Ling, E. A. et al.** (2003). F3/Contactin acts as a functional ligand for Notch during oligodendrocyte maturation. *Cell*. **115**, 163-175.
- Hubbard, S. R. and Till, J. H.** (2000). Protein tyrosine kinase structure and function. *Annu Rev Biochem.* **69**, 373-398. Review.
- Hummel, T., Schimmelpfeng, K. and Klämbt, C.** (1999a). Commissure formation in the embryonic CNS of *Drosophila*. *Dev Biol.* **209**, 381-398.
- Hummel, T., Schimmelpfeng, K. and Klämbt, C.** (1999b). Commissure formation in the embryonic CNS of *Drosophila*. *Development.* **126**, 771-779.
- Iwahara, T., Fujimoto, J., Wen, D., Cupples, R., Bucay, N., Arakawa, T., Mori, S., Ratzkin, B. and Yamamoto, T.** (1997). Molecular characterization of ALK, a receptor tyrosine kinase expressed specifically in the nervous system. *Oncogene*. **14**, 439-49.
- Jennings, B., Preiss, A., Delidakis, C. and Bray, S.** (1994). The Notch signaling pathway is required for *Enhancer of split* bHLH protein expression during neurogenesis in the *Drosophila* embryo. *Development.* **120**, 3537-3548.
- Karess, R. E. and Rubin, G. M.** (1984). Analysis of P transposable element functions in *Drosophila*. *Cell*. **38**, 135-146.
- Klapper, R., Heuser, S., Strasser, T. and Janning, W.** (2001). A new approach reveals syncytia within the visceral musculature of *Drosophila melanogaster*. *Development.* **128**, 2517-2524.
- Klapper, R., Stute, C., Schomaker, O., Strasser, T., Janning, W., Renkawitz-Pohl, R. and Holz, A.** (2002). The formation of syncytia within the visceral musculature of the *Drosophila* midgut is dependent on *duf*, *sns* and *mbc*. *Mech Dev.* **110**, 85-96.
- Klemenz, R., Weber, U. and Gehring, W. J.** (1987). The *white* gene as a marker in a new P-element vector for gene transfer in *Drosophila*. *Nucleic Acids Res.* **15**, 3947-3959.
- Kremser, T., Hasenpusch-Theil, K., Wagner, E., Buttgereit, D. and Renkawitz-Pohl, R.** (1999). Expression of the $\beta 3$ tubulin gene (β *Tub60D*) in the visceral mesoderm of *Drosophila* is dependent on a complex enhancer that binds Tinman and UBX. *Mol Gen Genet.* **262**, 643-658.
- Kuersten, S. and Goodwin, E. B.** (2003). The power of the 3'UTR: Translational control and development. *Nat Rev Gen.* **4**, 626-637.
- Kusch, T. and Reuter, R.** (1999). Functions for *Drosophila brachyenteron* and *forkhead* in mesoderm specification and cell signalling. *Development.* **126**, 3991-4003.
- Laemmli, U. K.** (1970). Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **227**, 680-685.
- Lai, E. C.** (2004). Notch signaling: control of cell communication and cell fate. *Development.* **131**, 965-973.

- Lam, G. and Thummel, C. S.** (2000). Inducible expression of double-stranded RNA directs specific genetic interference in *Drosophila*. *Curr Biol.* **10**, 957-963.
- Lassar, A. B. and Munsterberg, A.** (1994). Wiring diagrams: regulatory circuits and the control of skeletal myogenesis. *Curr Opin Cell Biol.* **6**, 432-442.
- Lawrence, N., Langdon, T., Brennan, K. and Martinez-Arias, A.** (2001). Notch signaling targets the Wingless responsiveness of a *Ubx* visceral mesoderm enhancer in *Drosophila*. *Curr Biol.* **11**, 375-385.
- Lawrence, P. A. and Johnston, P.** (1989). Pattern formation in the *Drosophila* embryo: allocation of cells to parasegments by *even skipped* and *fushi tarazu*. *Development.* **105**, 761-768.
- Lawson, M. A. and Purslow, P. P.** (2000). Differentiation of myoblasts in serum-free media: effects of modified media are cell line-specific. *Cells Tissues Organs.* **167**, 130-137.
- Le Borgne, R. and Schweisguth, F.** (2003). Unequal segregation of Neuralized biases Notch activation during asymmetric cell division. *Dev Cell.* **5**, 139-148.
- Lee, H. H., Norris, A., Weiss, J. B. and Frasch, M.** (2003). Jelly belly protein activates the receptor tyrosin kinase Alk to specify visceral muscle pioneers. *Nature.* **425**, 507-512.
- Leiss, D., Hinz, U., Gasch, A., Mertz, R. and Renkawitz-Pohl, R.** (1988). Differentiation of mesodermal derivatives during *Drosophila* embryogenesis is characterized by β 3 tubulin expression. *Development.* **104**, 525-531.
- Leptin, M., Casal, J., Grunewald, B. and Reuter, R.** (1992). Mechanisms of early *Drosophila* mesoderm formation. *Dev Suppl.* 23-31.
- Lieber, T., Kidd, S. and Young, M. W.** (2002). *kuzbanian* mediated cleavage of *Drosophila* Notch. *Genes Dev.* **16**, 209-221.
- Lieber, T., Kidd, S., Alcamo, E., Corbin, V. and Young, M. W.** (1993). Antineurogenic phenotypes induced by truncated Notch proteins indicate a role in signal transduction and may point to a novel function for *Notch* in nuclei. *Genes Dev.* **7**, 1949-1965.
- Lier, S.** (2002). Genetische und molekulare Analysen zur Funktion von Alien/CSN2 und Rpn6 in *Drosophila* weisen auf eine kooperative Beziehung zwischen Signalosom und Proteasom hin. Dissertation, Philipps-Universität Marburg.
- Lilly, B., Galewsky, S., Firulli, A. B., Schulz, R. A. and Olson, E. N.** (1994). D-MEF2: A MADS box transcription factor expressed in differentiating mesoderm and muscle cell lineages during *Drosophila* embryogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **91**, 5662-5666.
- Lilly, B., Zhao, B., Ranganayakulu, G., Paterson, B. M., Schulz, R. A. and Olson E. N.** (1995). Requirement of MADS domain transcription factor D-MEF2 for muscle formation in *Drosophila*. *Science.* **267**, 688-693.
- Lin, M. H., Nguyen, H. T., Dybalam C. and Storti, R. V.** (1996). Myocyte-specific enhancer factor 2 acts cooperatively with a muscle activator region to regulate *Drosophila* tropomyosin gene muscle expression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **93**, 4623-4628. Erratum in: *Proc Natl Acad Sci U S A.* **93**, 8152-8153.

- Lindsell, C. E., Shawber, C. J., Boulter, J. and Weinmaster, G.** (1995). Jagged: a mammalian ligand that activates Notch1. *Cell*. **80**, 909-917.
- Lindsley, D. L. and Zimm, G. G.** (1992). The genome of *Drosophila melanogaster*. Academic Press, San Diego.
- Lipoxygakis, P., Yu, S. Y., Delidakis, C. and Baker, N. E.** (1998). A subset of Notch functions during *Drosophila* eye development require Su(H) and the *E(spl)* gene Komplex. *Development*. **125**, 2893-2900.
- Lo, P. C. and Frasch, M.** (1998). *bagpipe*-dependent expression of *vimar*, a novel Armadillo-repeats gene, in *Drosophila* visceral mesoderm. *Mech Dev*. **72**, 65-75.
- Lorén, C. E., Englund, C., Grabbe, C., Hallberg, B., Hunter, T. and Palmer, R. H.** (2003). A crucial role for the Anaplastic lymphoma kinase receptor tyrosine kinase in gut development in *Drosophila melanogaster*. *EMBO Reports*. **4**, 781-786.
- Lorén, C. E., Scully, A., Grabbe, C., Edeen, P. T., Thomas, J., McKeown, M., Hunter, T. and Palmer, R. H.** (2001). Identification and characterization of DAlk: a novel *Drosophila melanogaster* RTK which drives ERK activation *in vivo*. *Genes to Cells*. **6**, 531-544.
- Macdonald, P.** (2001). Diversity in translational control. *Curr Opin Cell Biol*. **13**, 326-331.
- Maggert, K., Levine, M. and Frasch, M.** (1995). The somatic-visceral subdivision of the embryonic mesoderm is initiated by dorsal gradient thresholds in *Drosophila*. *Development*. **121**, 2107-2116.
- Martín-Bermudo, M. D., Gonzáles, F., Domínguez, M., Rodríguez, I., Ruiz-Gómez, M., Romani, S., Modolell, J. and Jiménez, F.** (1993). Molecular characterization of the *lethal of scute* genetic function. *Development*. **118**, 1003-1012.
- Martín-Bermudo, M. D., Martínez, C., Rodríguez, A. and Jiménez, F.** (1991). Distribution and function of the *lethal of scute* gene product during early neurogenesis in *Drosophila*. *Development*. **113**, 445-454.
- Matsuno, K., Diederich, R. J., Go, M. J., Blaumueller, C. M. and Artavanis-Tsakonas, S.** (1995). Deltex acts as a positive regulator of Notch signaling through interactions with the Notch ankyrin repeats. *Development*. **121**, 2633-2644.
- Matsuno, K., Go, M. J., Sun, X., Eastman, D. S. and Artavanis-Tsakonas, S.** (1997). Suppressor of Hairless-independent events in Notch signaling imply novel pathway elements. *Development*. **124**, 4265-4273.
- Menon, S. D. and Chia, W.** (2001). *Drosophila* rolling pebbles: a multidomain protein required for myoblast fusion that recruits D-Titin in response to the myoblast attractant Dumbfounded. *Dev Cell*. **1**, 691-703.
- Michelson, A. M., Gisselbrecht, S., Zhou, Y., Baek, K. H. and Buff, E. M.** (1998). Dual functions of the heartless fibroblast growth factor in development of the *Drosophila* embryonic mesoderm. *Dev Genetics*. **22**, 212-229.

- Moltekin, J. D., Black, B. L., Martin, J. F. and Olson, E. N.** (1995). Cooperative activation of muscle gene expression by Mef2 and myogenic bHLH proteins. *Cell*. **83**, 1125-1136.
- Morris, S. W., Kirstein, M. N., Valentine, M. B., Dittmer, K. G., Shapiro, D. N., Saltman, D. L. and Look, A. T.** (1994). Fusion of a kinase gene, ALK, to a nucleolar protein gene, NPM, in non-Hodgkin's lymphoma. *Science*. **263**, 1281-1284. Erratum in: *Science*. (1995) **267**, 316-317.
- Morris, S. W., Naeve, C., Mathew, P., James, P. L., Kirstein, M. N., Cui, X. and Witte, D. P.** (1997). Alk, the chromosom 2 gene locus altered by the t(2;5) in non-Hodgkin's lymphoma, encodes a novel receptor tyrosin kinase that is highly related to leucocyte tyrosine kinase (LTK). *Oncogene*. **14**, 2175-2188.
- Nguyen, H. T., Bodmer, R., Abmayr, S. M., McDermott, J. C. and Spoerel, N. A.** (1994). D-mef2: a *Drosophila* mesoderm-specific MADS box-containing gene with a biphasic expression profile during embryogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **91**, 7520-7524.
- Nilson, L. A. and Schupbach, T.** (1999). EGF receptor signaling in *Drosophila* oogenesis. *Curr Top Dev Biol*. **44**, 203-43. Review.
- Nolan, K. M., Barrett, K., Lu, Y., Hu, K. Q., Vincent, S. and Settleman, J.** (1998). Myoblast city, the *Drosophila* homolog of DOCK180/CED-5, is required in a Rac signaling pathway utilized for multiple developmental processes. *Genes Dev*. **12**, 3337-3342.
- Nose, A., Isshiki, T. and Takeichi, M.** (1998). Regional specification of muscle progenitors in *Drosophila*: the role of the *msh* homeobox gene. *Development*. **125**, 215-223.
- Nose, A., Mahajan, V. B. and Goodman, C. S.** (1992). Connectin: a homophilic cell adhesion molecule expressed on a subset of muscles and the motorneurons that innervate them in *Drosophila*. *Cell*. **70**, 553-567.
- Olivier, J. P., Raabe, T., Henkemeyer, M., Dickson, B., Mbamalu, G., Margolis, B., Schlessinger, J., Hafen, E. and Pawson, T.** (1993). A *Drosophila* SH2-SH3 adaptor protein implicated in coupling the sevenless tyrosine kinase to an activator of Ras guanine nucleotide exchange, Sos. *Cell*. **73**, 179-191.
- Olson, E. N.** (1990). The MyoD family, a paradigm for development? *Genes Dev*. **4**, 1454-1461.
- O'Neill, J. W. and Bier, E.** (1994). Double-label *in situ* hybridization using biotin and digoxigenin-tagged RNA probes. *Biotechniques*. **17**, 870, 874-875.
- Panin, V. M., Papayannopoulos, V., Wilson, R. and Irvine, K. D.** (1997). Fringe modulates Notch-ligand interactions. *Nature*. **387**, 908-912.
- Patel, N. H., Snow, P. M. and Goodman, C. S.** (1987). Characterization and cloning of Fasciclin III: A glycoprotein expressed on a subset of neurons and axon pathways in *Drosophila*. *Cell*. **48**, 975-988.
- Paululat, A., Holz, A. and Renkawitz-Pohl, R.** (1999). Essential genes for myoblast fusion

in *Drosophila* embryogenesis. *Mech Dev.* **83**, 17-26.

Perrimon, N. and Perkins, L. A. (1997). There must be 50 ways to rule the signal: the case of the *Drosophila* EGF receptor. *Cell.* **89**, 13-16. Review.

Piccin, A., Salameh, A., Benna, C., Sandrelli, F., Mazzotta, G., Zordan, M., Rosato, E., Kyriacou, C. P. and Costa, R. (2001). Efficient and heritable functional knock-out of an adult phenotype in *Drosophila* using a GAL4-driven hairpin RNA incorporating a heterologous spacer. *Nucleic Acids Res.* **29**, E55-65.

Pirrotta, V. (1988). Vectors for P-mediated transformation in *Drosophila*. *Biotechnology.* **10**, 437-456.

Pulford, K., Lamant, L., Morris, S. W., Butler, L. H., Wood, K. M., Stroud, D., Delsol, G. and Mason, D. Y. (1997). Detection of anaplastic lymphoma kinase (Alk) and nucleolar protein nucleophosmin (NPM)-Alk proteins in normal and neoplastic cells with the monoclonal antibody Alk1. *Blood.* **89**, 1394-1404.

Pulford, K., Morris, S. W. and Turturro, F. (2004). Anaplastic lymphoma kinase proteins in growth control and cancer. *J Cell Physiol.* **199**, 330-358. Review.

Ramain, P., Khechumian, K., Seugnet, L., Arbogast, N., Ackermann, C. and Heitzler, P. (2001). Novel Notch alleles reveal a Deltex-dependent pathway repressing neural fate. *Curr Biol.* **11**, 1729-1738.

Ranganayakulu, G., Zhao, B., Dokidis, A., Molkentin, J. D., Olson, E. N. and Schulz, R. A. (1995). A series of mutations in the D-MEF2 transcription factor reveal multiple functions in larval and adult myogenesis in *Drosophila*. *Dev Biol.* **171**, 169-181.

Rau, A., Buttgereit, D., Holz, A., Fetter, R., Doberstein, S.K., Paululat, A., Staudt, N., Skeath, J., Michelson, A. M. and Renkawitz-Pohl, R. (2001). *rolling pebbles (rols)* is required in *Drosophila* muscle precursors for recruitment of myoblasts for fusion. *Development.* **128**, 5061-5073.

Rebay, I. (2002). Keeping the receptor tyrosine kinase signaling pathway in check: lessons from *Drosophila*. *Dev Biol.* **251**, 1-17. Review.

Rebay, I., Fehon, R. G. and Artavanis-Tsakonas, S. (1993). Specific truncation of *Drosophila* Notch define dominant activated and dominant negative forms of the receptor. *Cell.* **74**, 319-329.

Rebay, I., Fleming, R. J., Fehon, R. G., Cherbas, L., Cherbas, P. and Artavanis-Tsakonas, S. (1991). Specific EGF repeats of Notch mediate interactions with Delta and Serrate: Implications for Notch as a multifunctional receptor. *Cell.* **67**, 687-699.

Reznikoff, C. A., Brankow, D. W. and Heidelberger, C. (1973). Establishment and characterization of a cloned line of C3H mouse embryo cells sensitive to postconfluence inhibition of division. *Cancer Res.* **33**, 3231-3238.

Riechmann, V., Irion, U., Wilson, R., Grosskortenhaus, R. and Leptin, M. (1997). Control of cell fates and segmentation in the *Drosophila* mesoderm. *Development.* **124**, 2915-2922.

- Röttgen, G., Wagner, T. and Hinz, U.** (1998). A genetic screen for elements of the network that regulates neurogenesis in *Drosophila*. *Mol Gen Genet.* **257**, 442-451.
- Rubin, G. M. and Spradling, A. C.** (1982). Genetic transformation of *Drosophila* with transposable element vectors. *Science.* **218**, 348-353.
- Ruiz-Gómez, M.** (1998). Muscle patterning and specification in *Drosophila*. *Int J Dev Biol.* **42**, 283-290. Review.
- Ruiz-Gómez, M., Coutts, N., Price, A., Taylor, M.V. and Bate, M.** (2000). *Drosophila* Dumbfounded: A myoblast attractant essential for fusion. *Cell.* **102**, 189-198.
- Ruiz-Gómez, M., Coutts, N., Suster, M. L., Landgraf, M. and Bate, M.** (2002). *myoblasts incompetent* encodes a zinc finger transcription factor required to specify fusion-competent myoblasts in *Drosophila*. *Development.* **129**, 189-198.
- Rusconi, J. C. and Corbin, V.** (1998). Evidence for a novel Notch pathway required for muscle precursor selection in *Drosophila*. *Mech Dev.* **79**, 39-50.
- Rushton, E., Drysdale, R., Abmayr, S. M., Michelson, A. M. and Bate, M.** (1995). Mutations in a novel gene, *myoblast city*, provide evidence in support of the founder cell hypothesis for *Drosophila* muscle development. *Development.* **121**, 1979-1988.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. and Ehrlich, H. A.** (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science.* **239**, 487-491.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T.** (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- San Martin, B., Ruiz-Gómez, M., Landgraf, M. and Bate, M.** (2001). A distinct set of founders and fusion-competent myoblasts make visceral muscles in the *Drosophila* embryo. *Development.* **128**, 3331-3338.
- Scherer, L. J. and Rossi, J. J.** (2003). Approaches for the sequence-specific knockdown of mRNA. *Nature biotech.* **21**, 1457-1465.
- Schlessinger, J.** (2000). Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell.* **103**, 211-25.
- Schroter, R. H., Lier, S., Holz, A., Bogdan, S., Klambt, C., Beck, L. and Renkawitz-Pohl, R.** (2004). *kette* and *blown fuse* interact genetically during the second fusion step of myogenesis in *Drosophila*. *Development.* **131**, 4501-9.
- Shawber, C., Nofziger, D., Hsieh, J. J. D., Lindsell, C., Bögl, O., Hayward, D. and Weinmaster, G.** (1996). Notch signaling inhibits muscle cell differentiation through a CBF1-independent pathway. *Development.* **122**, 3765-3773.
- Shih, C. and Weinberg, R. A.** (1982). Isolation of a transforming sequence from a human bladder carcinoma cell line. *Cell.* **29**, 161-169.

- Shilo, B. Z.** (2003). Signaling by the *Drosophila* epidermal growth factor receptor pathway during development. *Exp Cell Res.* **284**, 140-149. Review.
- Simcox, A.** (1997). Differential requirement for EGF-like ligands in *Drosophila* wing development. *Mech Dev.* **62**, 41-50.
- Souttou, B., Carvalho, N. B., Raulais, D. and Vigny, M.** (2001). Activation of anaplastic lymphoma kinase receptor tyrosine kinase induces neuronal differentiation through the mitogen-activated protein kinase pathway. *J Biol Chem.* **276**, 9526-31.
- Spradling, A. C. and Rubin, G. M.** (1982). Transposition of cloned P elements into *Drosophila* germ line chromosomes. *Science.* **218**, 341-347.
- Stathopoulos, A., Tam, B., Ronshaugen, M., Frasch, M. and Levine, M.** (2004). *pyramus* and *thisbe*: FGF genes that pattern the mesoderm of *Drosophila* embryos. *Genes Dev.* **18**, 687-699.
- Steller, H. and Pirrotta, V.** (1986). P transposons controlled by the heat shock promoter. *Mol Cell Biol.* **6**, 1640-1649.
- Stoica, G. E., Kuo, A., Aigner, A., Sunitha, I., Souttou, B., Malerczyk, C., Caughey, D. J., Wen, D., Karavanov, A., Riegel, A. T. and Wellstein, A.** (2001). Identification of Anaplastic Lymphoma Kinase as a receptor for the growth factor Pleiotrophin. *J Biol Chem.* **276**, 16772-16779.
- Stronach, B. E., Renfranz, P. J., Lilly, B. and Beckerle, M. C.** (1999). Muscle LIM proteins are associated with muscle sarcomeres and require dMEF2 for their expression during *Drosophila* myogenesis. *Mol Biol Cell.* **10**, 2329-2342.
- Strükelberg, M., Bonengel, B., Moda, L. M., Hertenstein, A., de Couet, H. G., Ramos, R. G. and Fischbach, K. F.** (2001). *rst* and *ist* paralogue *kirre* act redundantly during embryonic muscle development in *Drosophila*. *Development.* **128**, 4229-4239.
- Tapanes-Castillo, A. and Baylies, M. K.** (2004). Notch signaling patterns *Drosophila* mesoderm segments by regulating the bHLH transcription factor *twist*. *Development.* **131**, 2359-2372.
- Tautz, D. and Pfeifle, C.** (1989). A non-radioactive *in situ* hybridization method for the localization of specific RNAs in *Drosophila* embryos reveals translational control of the segmentation gene *hunchback*. *Chromosoma.* **98**, 81-85.
- Tavernarakis, N., Wang, S. L., Dorovkov, M., Ryazanov, A. and Driscoll, M.** (2000). Heritable and inducible genetic interference by double-stranded RNA encoded by transgenes. *Nat Genet.* **24**, 180-183.
- Taylor, M.** (2002). *Drosophila* development: novel signal elicits visceral response. *Curr Biol.* **12**, R102-R104.
- Taylor, M. V., Beatty, K. E., Hunter, H. K. and Baylies, M. K.** (1995). *Drosophila* MEF2 is regulated by twist and is expressed in both the primordia and differentiated cells of the embryonic somatic, visceral and heart musculature. *Mech Dev.* **50**, 29-41. Erratum in: *Mech Dev.* (1995) **51**, 139-41.

Thummel, C. S., Boulet, A. M. and Lipshitz, H. D. (1988). Vectors for *Drosophila* P-element-mediated transformation and tissue culture transfection. *Gene*. **74**, 445-456.

van der Geer, P., Hunter, T. and Lindberg, R. A. (1994). Receptor protein-tyrosine kinases and their signal transduction pathways. *Annu Rev Cell Biol*. **10**, 251-337. Review.

Weintraub, H., Davis, R., Tapscott, S., Thayer, M., Krause, M., Benzra, R., Blackwell, T. K., Turner, D., Rupp, R., Hollenberg, S., et al. (1991). The myoD gene family: nodal point during specification of the muscle cell lineage. *Science*. **251**, 761-766.

Weiss, J., Suyama, K. L., Lee, H. and Scott, M. P. (2001). Jelly belly: a *Drosophila* LDL receptor repeat-containing signal required for mesoderm migration and differentiation. *Cell*. **107**, 387-398.

Wright, W. E. (1992). Muscle basic helix-loop-helix proteins and the regulation of myogenesis. *Curr Opin Genet Dev*. **2**, 243-248.

Yaffe, D. and Saxel, O. (1977). Serial passaging and differentiation of myogenic cells isolated from dystrophic mouse muscle. *Nature*. **270**, 725-727.

Yarden, Y. and Ullrich, A. (1988). Molecular analysis of signal transduction by growth factors. *Biochemistry*. **27**, 3113-3119. Review.

Yoshiko, Y., Hirao, K., Sakabe, K., Seiki, K., Takezawa, J. and Maeda, N. (1996). Autonomous control of expression of genes for insulin-like growth factors during the proliferation and differentiation of C2C12 mouse myoblasts in serum-free culture. *Life Sci*. **59**, 1961-8.

Zaffran, S. and Frasch, M. (2002). The *beta 3 tubulin* gene is a direct target of *bagpipe* and *biniou* in the visceral mesoderm of *Drosophila*. *Mech Dev*. **114**, 85-93.

Zaffran, S., Küchler, A., Lee, H. and Frasch, M. (2001). *biniou* (*FoxF*), a central component in a regulatory network controlling visceral mesoderm development and midgut morphogenesis in *Drosophila*. *Genes Dev*. **15**, 2900-2915.

Zhang, Y., Featherstone, D., Davis, W., Rushton, E. and Broadie, K. (2000). *Drosophila D-titin* is required for myoblast fusion and skeletal muscle striation. *J Cell Sci*. **113**, 3103-3115.

8. Abkürzungen

Ac-Sc	Achaete-Scute
Alk	Anaplastic lymphoma kinase
Ants	Antisocial
AP	alkalische Phosphatase
ATP	Adenosin triphosphat
BAC	Bacterial Artificial Chromosome
Bap	Bagpipe
BCIP	X-phosphate/5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate
bHLH	basic Helix-Loop-Helix
Bin	Biniou
Blow	Blown fuse
bp	Basenpaare
BSA	Bovine Serum Albumin
cDNA	codierende DNA
CG	vorhergesagtes Gen ("computed gene")
Croc	Crocodile
CTP	Cytidin triphosphat
Dab	Disabeld
DER	<i>Drosophila</i> Epidermal Growth Factor Receptor
DK3	Defizienzen Kit für das 3. Chromosom
DI	Delta
DM	Differenzierungsmedium
dn	dominant negativ
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dpERK	diphospho-ERK
Dpp	Decapentaplegic
DRK	Downstream of Receptor Kinase
Dsh	Disheveled
DSL	Delta-Serrate-LAG
dsRNA	doppelstrang Ribonukleinsäure ("double-stranded ribonucleic acid")
Duf	Dumbfounded
Dx	Deltex
E(spl)	Enhancer of split

EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal Growth Factor
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
EM	Einfriermedium
EMS	Ethylmethan Sulfonat
En	Engrailed
ERK	Extracellular Regulated Kinase
EtOH	Ethanol
Eve	Even skipped
FasIII	FasciclinIII
FCM	fusionskompetente Myoblasten
FCS	Fetal calv Serum
FGF	Fibroblast Growth Factor
Fng	Fringe
GAP	GTPase aktivierendes Protein
Gbe	Grainyhead Binding Elements
GDP	Guanin diphosphat
GFP	Grün Fluoreszierendes Protein
Glee	Gleefull
GM	Wachstumsmedium (Growth Medium)
GMRP	Guanin Nukleotid Austauschfaktor („guanine nucleotide releasing factor“)
Grh	Grainyhead
GTP	Guanin triphosphat
H	Hairless
Hbs	Hibris
Hh	Hedgehog
HS	Hybridisierungslösung
HS	Pferdeserum (Horse-Serum)
Htl	Heartless
Ig	Immunoglobuline
IrreC	Irregular chiasm C
Jeb	Jelly belly
kb	Kilobasenpaare
Kirre	Kin of irregular chiasm C
Kuz	Kuzbanian

L ['] sc	Lethal of scute
LDL	Low Density Lipoprotein
Lmd	Lame duck
MAM	Mephrins, A-5 Protein und Receptor Protein Tyrosin Phosphatase mu
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
Mbc	Myoblast city
MCS	Multiple Klonierungsstelle ("Multiple Cloning Site")
Mef2	Myocyte enhancing factor 2
Mhc	Myosin heavy chain
Mili	Milliways
min	Minute(n)
Minc	Myoblast incompetent
mRNA	Boten-RNA ("messenger ribonucleic acid")
N	Notch
NBT	4-Nitro blue tetrazolium chloride ("nitro blue tetrazolium")
OD	optische Dichte
ORF	offener Leserahmen ("open reading frame")
PBS	Natriumphosphatpuffer ("phosphate buffered saline")
PCR	Polymerase-Kettenreaktion ("polymerase chain reaction")
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PS	Parasegment
PTK	Phospho Tyrosin Kinase
RISC	RNA induced silencing Complex
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA Interferenz
Rols	Rolling pepples
Rst	Roughest
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptor Tyrosin Kinase
SDS	Sodiumdodecylsulfat
sec	Sekunde(n)
Ser	Serrate
Sgg	Shaggy
SH2	Src Homology 2
siRNA	small interfering RNA

Slp	Sloppy paired
sm	somatisches Mesoderm
Sns	Sticks and stones
SOP	Sinnesorgan-Vorläuferzelle (“Sensory Organ Precursor”)
Srp	Serpent
Su(H)	Suppressor of hairless
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
TGF	Transforming Growth Factor
Tin	Tinman
TM	Transfektionsmedium
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Triton X-100	Octylphenolpoly(ethylenglycolether) ₁₀
TTP	Thymin triphosphat
Twist	Twist
U	Einheit („unit“)
ü. N.	über Nacht
UAS	Upstream Activating Sequence
Ubx	Ultrabithorax
UpM	Umdrehungen pro Minute
UTR	nicht translatierte Region (“untranslated region“)
UV	Ultraviolett
V	Volt
vm	viszerales Mesoderm
VT	Volumenteile
w/v	Gewicht pro Volumen
Weli	Wellville
Wg	Wingless
WT	Wildtyp

9. Anhang

9.1 Bindestellen für Transkriptionsfaktoren

Gezeigt sind die Sequenzen der Bindestellen von Transkriptionsfaktoren die eine Rolle in der Entwicklung des Mesoderms spielen.

Transkriptionsfaktor	Bindestelle	Literatur
Biniou	RYAAAYA	Zaffran et al., 2001
Lame duck	TTACCTACGCAGCGTTTACA	Duan et al., 2001
Mef2	YTAWWAAATAR	Nguyen et al., 1994
Mef2	YTAWWWWTAR	Ranganayakulu et al., 1995
Mef2	gTTAAAAATAAa	Lin et al., 1996
Mef2	YTAWWWWTAR	Stronach et al., 1999
Tinman/Bagpipe	TCAAGTGC	Zaffran et al., 2002

R = A oder G

Y = T oder C

W = A oder T

9.2 Komplementationstest der mutanten Allele V3, V5, V6 und V7 mit Defizienzen des 3. Chromosom

Gezeigt sind die Komplementationstest der Mutanten V3, V5, V6 und V9 mit dem Defizienzen Kit des 3. Chromosoms (*Bloomington Drosophila Stock Center*). Einige Kreuzungen konnten nicht durchgeführt werden, da die defizienten Fliegenlinien aufgrund der geringen Vitalität trotz des Balancers leicht eingingen. Dies geschah teilweise bevor die Kreuzungen erfolgreich angesetzt werden konnten und ausreichend Nachkommen für die Auswertung erhalten werden konnten.

	V3	V5	V6	V7
BL 383	vital	vital	vital	vital
BL 430	vital	vital	vital	vital
BL 439	vital	vital	vital	vital
BL 463	vital	vital	vital	vital
BL 669	vital	vital	vital	vital
BL 823	vital	vital	vital	vital
BL 997	letal	vital	vital	vital
BL 1919	vital	vital	vital	vital
BL 1518	vital	vital	vital	vital
BL 1534	vital	vital	letal	vital
BL 1541	vital	vital	vital	vital
BL 1688	vital	vital	vital	vital
BL 1884	vital	vital	vital	vital
BL 1910	letal ¹	vital ¹	vital ¹	vital ¹
BL 1931	vital	vital	vital	vital
BL 1962	vital	letal	vital	vital
BL 1990	letal	vital	vital	vital
BL 2052	vital	vital	vital	vital
BL 2363	vital	vital	vital	vital
BL 2393	letal	vital	vital	vital
BL 2400		vital	vital	vital
BL 2425	vital	vital		vital
BL 2479	vital	vital	vital	vital
BL 2577	vital	vital	vital	vital
BL 2585	vital	vital	vital	vital
BL 2586	vital	vital	vital	vital
BL 2608	letal ²	letal ²	letal ²	letal ²
BL 2612	vital	letal	vital	vital
BL 2993	vital	vital	vital	vital
BL 2998	vital	vital	vital	vital
BL 3007	vital	vital	vital	vital
BL 3011	vital	vital	vital	vital
BL 3012	vital	vital	vital	vital
BL 3024	vital	vital	vital	vital
BL 3068	vital	vital	vital	vital
BL 3071	vital	letal	vital	vital
BL 3096	vital	vital	vital	vital
BL 3124	vital	vital	letal	vital
BL 3126	vital	vital	vital	vital
BL 3127	vital	vital	vital	vital
BL 3128	vital	vital		vital

	V3	V5	V6	V7
BL 3340	letal²	letal²	letal²	letal²
BL 3546		vital	vital	vital
BL 3547	vital	vital	vital	letal
BL 3640	vital	vital	vital	vital
BL 3649	vital	vital	letal	vital
BL 3686	vital	vital		vital
BL 4366	vital	vital	vital	vital
BL 4370	letal	letal	vital	vital
BL 4393	vital	vital		vital
BL 4430	vital	vital	vital	vital
BL 4431	letal	vital	vital	vital
BL 4432	vital	vital	vital	vital
BL 4500	letal	vital	vital	vital
BL 4506	vital	vital	vital	vital
BL 4787	vital	vital	vital	vital
BL 4940	vital	vital	vital	vital
BL 4962	vital	vital	vital	
BL 5126	vital	vital	vital	vital
BL 5411	vital	vital	vital	vital
BL 5492	vital	vital	vital	vital
BL 5601	vital	vital	vital	vital
BL 5694		vital	vital	vital
BL 5877	vital	vital	vital	vital
BL 6411	vital	vital	vital	vital
BL 6456	vital	vital	vital	vital
BL 6457	vital	vital	vital	vital
BL 6460	vital	vital	vital	vital
BL 6471	letal			
BL 6551	letal	vital	vital	vital

¹: Die Defizienz ist über dem Balancer *SbTdlz* nicht vital, kann aber die EMS-Allele komplementieren

²: Die Defizienz ist nach der Kreuzung mit einer anderen Linie nicht mehr vital, obwohl keine Inversion oder Duplikation in der Ausgangslinie vorhanden ist.

DANKE....

Danken möchte ich....

... unserer „Chefin“, Prof. Renate Renkawitz-Pohl für die Unterstützung während meiner Doktorarbeit

... Prof. Monika Hassel für die Übernahme des Zweitgutachtens

... Dr. Anne Holz für die Betreuung meines Themas, sowie die detaillierte Einführung in die Geheimnisse der *Drosophila*-Genetik

... Ruth Hyland und Dominik Helmecke für die Injektion der *Drosophila*-Embryonen

... der Philipps-Universität Marburg und dem Land Hessen für die Bewilligung eines Promotionsstipendiums

... der European Molecular Biology Organisation (EMBO) die mir durch die Bewilligung eines Stipendiums meinen Aufenthalt in Umea, Schweden ermöglichte

... Dr. Ruth Palmer und ihrer gesamten Arbeitsgruppe für die nette Aufnahme, besonders Gaurav Varshney der nie ungeduldig wurde, mich in die Geheimnisse der Zellkultur einzuführen

... Jotti, Nina, Nina, Christina und Roxi dafür, daß sie mir während der Zeit meiner Dissertation nicht nur Arbeitskollegen, sondern auch gute Freunde wurden

... der gesamten Arbeitsgruppe Renkawitz-Pohl für die tolle Arbeitsatmosphäre

... meiner Familie, meinen Freunden und natürlich Henning, die sowieso die Besten sind

Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation

Die Determination der Founder- und fusionskompetenten Zellen des viszeralen Mesoderms von *Drosophila melanogaster* ist abhängig vom Notch-Signalweg sowie Jeb/Mili vermitteltem RTK-Signalweg

unter der Leitung von Frau Prof. Dr. R. Renkawitz-Pohl (Fachbereich Biologie, Philipps-Universität Marburg) selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich angegebenen Quellen und Hilfen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg, 8.11.2004

Teile der vorliegenden Arbeit wurden in folgender Originalpublikation veröffentlicht:

Stute, C., Schimmelpfeng, K., Renkawitz-Pohl, R., Palmer, R. H. and Holz, A. (2004).

Myoblast determination in the somatic and visceral mesoderm depends on Notch signalling as well as on *milliways* (*mill^{Alk}*) as receptor for Jeb signalling. *Development*. **131**, 743-754.

weitere Publikationen:

Klapper, R., Stute, C., Schomaker, O., Strasser, T., Janning, W., Renkawitz-Pohl, R.

and Holz, A. (2002). The formation of syncytia within the visceral musculature of the *Drosophila* midgut is dependent on *duf*, *sns* and *mbc*. *Mech Dev*. **110**, 85-96.